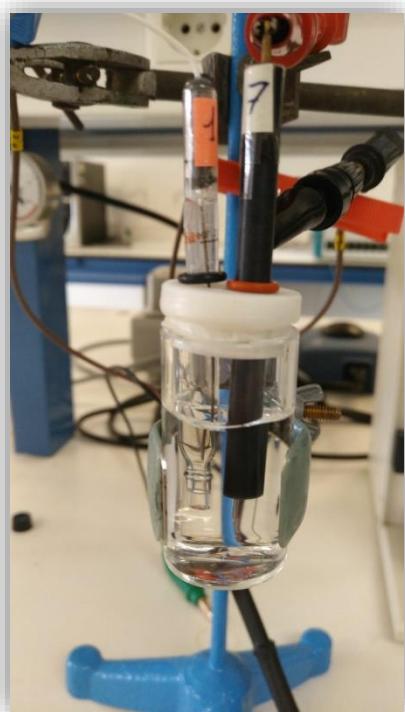


TRABAJO DE FIN DE GRADO

Diseño de sensores electroquímicos para la detección y cuantificación de nanopartículas de plata



AUTOR: Sonia Menés Olivares

DIRECTOR: Juan Carlos Vidal Ibáñez

Facultad de ciencias – Universidad de Zaragoza
Grado en Química – Dto. Química Analítica
Convocatoria: septiembre 2018

INDICE

Resumen	2
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 Electropolimerización de la L-Lisina	7
2.3.3 Electropolimerización del Tiofeno-3-tiocarboxamida.....	7
2.3.4 Cuantificación de las AgNPs con electrodos modificados y no modificados	8
3. Resultados y discusión	9
3.1 Electrodo modificado L-Lisina	9
3.2 Electrodo modificado Tiofeno-3-carboxamida	15
3.3 Electrodo sin modificar	18
4. Conclusiones	21
5. Bibliografía.....	23
Abreviaturas	25

Resumen

Se ha estudiado la detección y cuantificación de **nanopartículas de plata (AgNPs)** mediante técnicas voltamétricas, empleando ligandos inmovilizados sobre la superficie de un electrodo.

Para ello, se propone de forma novedosa el uso de la **electropoliomerización** de un monómero que produzca oligómeros fuertemente adheridos a la superficie *glassy-carbon* de electrodos de trabajo de pequeño diámetro, y que estos oligómeros contengan un buen número de grupos funcionales (sulfuro y amino) orientados y capaces de retener a las nanopartículas metálicas de plata.

Los monómeros (ligandos) estudiados fueron la **L-lisina (L-Lys)** y el **tiofeno-3-tiocarboxamida (PTPh)**. Las electropoliomerizaciones se optimizaron para este propósito y se llevaron a cabo mediante barridos cíclicos de potencial que implican potenciales anódicos altos para la formación inicial de los radicales libres.

El procedimiento propuesto está basado en la denominada **voltametría de nanopartículas inmovilizadas**, depositando un pequeño volumen ($10 \mu\text{L}$) de dispersión de las AgNPs sobre el electrodo de trabajo (modificado o sin modificar), y secando la disolución con corriente de N_2 previamente a la medida voltamétrica de redisolución.

Se observó que los electrodos respondieron tanto a las AgNPs como a **plata iónica Ag^+** , dado que los polímeros presentaron una fuerte retención también hacia los iones Ag^+ . De esta forma, el estudio presentado permite diferenciar entre ambas especies de plata, en función del tipo de barrido de potenciales empleado. Se empleó voltametría diferencial de pulsos, de gran sensibilidad instrumental.

El objetivo de este trabajo no fue el desarrollo de nuevos procedimientos analíticos y su validación, sino establecer las bases como **prueba de concepto** del uso de la electropoliomerización como nuevo procedimiento de modificación de un electrodo que sirva para la retención selectiva de nanopartículas de plata, y para su posterior cuantificación electroquímica.

Los resultados obtenidos permiten el diseño de nuevos **sensores** para la detección rápida y cuantificación de estas nanopartículas.

Abstract

The detection and quantification of **silver nanoparticles (AgNPs)** has been studied with voltammetric techniques, by using ligands immobilized on the surface of an electrode.

For this purpose, the use of **electropolymerization** of a monomer producing oligomers strongly adhered to the glassy-carbon surface of working electrodes of small diameter is proposed, and that these oligomers contain a good number of functional groups (sulfur and amino) oriented and capable of retaining metallic silver nanoparticles.

The monomers (ligands) studied were **L-lysine (L-Lys)** and **thiophene-3-thiocarboxamide (PTPh)**. The electropolymerizations were optimized for this purpose and were carried out by cyclic potential sweeps involving high anodic potentials for the initial formation of the free radicals.

The proposed procedure is based on the so-called **voltammetry of immobilized nanoparticles**, depositing a small volume (10 µL) of dispersion of the AgNPs on the working electrode (modified or unmodified), and drying the solution with N₂ current prior to measurement voltammetric redissolution.

It was observed that the electrodes responded both AgNPs and **Ag⁺ ions**, since the polymers showed a strong retention also towards ionic Ag⁺ ions. In this way, the study presented allows to differentiate between both species of silver, depending on the type of potential sweep conditions. Pulse differential voltammetry was used, with great instrumental sensitivity.

The objective of this work was not the development of new analytical procedures and their validation, but to establish the bases as **proof of concept** of the use of electropolymerization as a new method of modifying an electrode that serves for the selective retention of silver nanoparticles, and for its subsequent electrochemical quantification.

The results obtained allow the design of new **sensors** for the rapid detection and quantification of these nanoparticles.

1. Introducción

La Unión Europea (UE) define a los **nanomateriales** (NMs) artificiales como materiales manufacturados, insolubles y biopersistentes, con unas dimensiones internas en una escala de 1 a 100 nm. [(1)]. Desde hace pocos años, son considerados por la UE como **contaminantes emergentes**, lo que significa una legislación que es cada vez más restrictiva, y que depende de la metodología analítica que se va desarrollando, como consecuencia de una investigación reciente pero cada vez más intensa en este campo [(2; 3) (4)].

Estos NMs se **incorporan** cada vez en un más amplio rango de productos industriales y de consumo, por sus propiedades catalíticas, biocompatibilidad, capacidad de adsorción de otros compuestos, potencial funcionalización de su superficie, o su alta relación de superficie a masa, lo que inevitablemente conlleva a una mayor exposición y acumulación en el medio ambiente o en alimentos, con efectos muy perjudiciales sobre la **salud humana** [(4)]. Por este motivo, desde hace pocos años, se lleva a cabo una investigación muy intensa para el desarrollo de nueva metodología analítica para la cuantificación de NMs, dadas las exigencias legislativas cada vez mayores de la UE [(3)].

Más concretamente, las **n nanopartículas de Plata** (AgNPs) son las más empleadas, por sus propiedades ópticas, eléctricas y antimicrobianas, y su presencia se encuentra en multitud de productos de consumo, por ejemplo, en cosméticos, aditivos alimentarios, envases para alimentos, textiles, pastas de dientes, o en muy diversas aplicaciones médicas [(5) (6)]. En pequeñas concentraciones (del orden de muy pocos ppm's o incluso ppb's) no son tóxicas para las células humanas, aunque letales para la mayoría de bacterias o virus, de ahí su uso antimicrobiano, fungicida o bactericida [(7) (8)]. Pero, en todos los casos, es preciso controlar su concentración por debajo de los niveles de concentración permitidos por la legislación (muy pequeños) que no supongan un riesgo para la salud o un problema de contaminación medioambiental [(8)].

Por los motivos anteriores, se precisan **procedimientos analíticos** muy sensibles para el control de las AgNPs. Existen técnicas de cuantificación y caracterización de AgNPs muy potentes, como por ejemplo microscopía electrónica (SEM/TEM), dispersión de rayos X, espectroscopía de absorción atómica, o plasma de acoplamiento inductivo con detección de espectrometría de masas [(2) (9)]. Estas técnicas suelen acoplarse a procedimientos de **separación** como ultrafiltración, extracción en punto de nube, fraccionamiento en flujo de campo asimétrico (AF4), electroforesis capilar sobre gel o centrifugación en gradiente de densidad [(9)].

Por otro lado, las **técnicas voltamétricas** de redisolución son de las más potentes para la determinación de metales, y permiten la determinación de nanopartículas metálicas muy por debajo de ng mL^{-1} [(10)]. Su elevada sensibilidad se debe a una etapa previa de concentración sobre el electrodo de trabajo. Sin embargo, existen muy pocas referencias bibliográficas sobre la utilización de estas técnicas como sistemas de transducción en sensores de respuesta rápida para estas NPs.

En la bibliografía se han descrito procedimientos voltamétricos también muy potentes para el estudio y **caracterización de AgNPs**, empleando técnicas de voltametría de (nano)partículas inmovilizadas [(11)], y culombimetría de colisión o de impacto de nanopartículas [(12)]. Incluso, se han diseñado polímeros modelados molecularmente (MIPs) para la determinación selectiva por tamaño de AgNPs, bajo el concepto de matrices poliméricas de impronta de nanopartículas [(13)].

Las técnicas analíticas anteriores suponen una **complejidad instrumental** y de manejo importantes, y suelen emplearse como técnicas de confirmación (métodos de retaguardia) [(14)]. Por este motivo, cada vez son más requeridos métodos analíticos simples que permitan de forma rápida la detección, cuantificación, e incluso la caracterización de las AgNPs (tamaño, forma, estado de agregación, o caracterización de su estado superficial). Y, en este sentido, aunque todavía en una fase incipiente, la aparición de nuevos **(bio)sensores** para AgNPs (y NMIs en general) suponen un avance muy importante [(15)].

En la actualidad, hay un gran volumen de investigación en biosensores, particularmente electroanalíticos por su sencillez, portabilidad y sensibilidad, en numerosas aplicaciones en el medio ambiente, salud, y agroalimentaria [(16)]. Para aplicaciones con riesgos para la salud humana, constituyen los llamados procedimientos de vanguardia o de alerta previa, y que posteriormente son confirmados por los métodos de retaguardia, normalmente técnicas instrumentales de mucha mayor complejidad, como las mencionadas anteriormente [(14)].

En la bibliografía se han descrito algunos (muy pocos) **sensores electroquímicos** para la cuantificación selectiva de AgNPs, basados en ligandos de afinidad o complejantes de las AgNPs [(17) (15)]. Por ejemplo, SCN^- [(18)], cisteína [(19)], poli-(ácido-amino), tiourea, bi-piridina, el grupo tiol [(20)], el grupo amino, carboxilato, metalotioneínas [(21)], la fito-quelatina o el N-alquil-pirazol [(22)], entre otros.

En el trabajo que ahora se presenta en esta memoria, se ha estudiado el diseño de nuevos sensores voltamétricos para la detección y cuantificación de AgNPs. Para ello, se han abordado procedimientos de **electropolimerización** de monómeros que dieran lugar a polímeros inmovilizados sobre el electrodo de trabajo, con un gran número de grupos funcionales que fueran capaces de retener selectivamente a las AgNPs.

La electropolimerización es un procedimiento de formación de oligómeros insolubles sobre la superficie del electrodo de trabajo voltamétrico, aplicando un potencial oxidante que forma un radical iniciador sobre el monómero. Normalmente se ha empleado procedimientos de electropolimerización en nuestro grupo de investigación para el entrampamiento de moléculas (enzimas o anticuerpos) en la fabricación de biosensores amperométricos, o en la formación de multicapas de exclusión por tamaño o por carga [(23)].

En este trabajo, hemos estudiado la L-lisina y el tiofeno-3-tiocarboxamida. Es conocida la capacidad de la **L-lisina**, y en general de los aminoácidos, de formar oligómeros a potenciales muy oxidantes (cerca a +2.0 V.), a la vez que se pueden formar enlaces C-N sobre electrodos de carbón que inmovilizan al oligómero sobre estos electrodos [(24)]. También está muy estudiada la síntesis de **poli-tiofenos**, a partir del monómero tiofeno o de monómeros sustituidos en posición 3' o 2', formando oligómeros muy insolubles en agua [(25)]. A su vez, éstos se oxidan muy fácilmente a sulfonas, obteniéndose mezclas de politiofeno oxidado y sobreoxidado con distintas propiedades para su uso en un biosensor electroquímico.

El **grupo de investigación** en el que se ha realizado el trabajo experimental de laboratorio correspondiente a éste TFG tiene una experiencia muy importante en procedimientos de electropolimerización para la modificación de electrodos voltamétricos, para ser empleados en biosensores amperométricos o de otro tipo en diversas aplicaciones analíticas [(26)], y en la caracterización electroquímica de AgNPs [(27)]

Esta aproximación para el diseño de **sensores para AgNPs**, basada en la electropolimerización de un monómero escogido, es novedosa, pues hasta nuestro conocimiento no hemos encontrado referencias similares en la bibliografía científica para la detección de AgNPs, al menos con los dos monómeros que ahora proponemos en este trabajo, la L-lisina y el tiofeno-3-tiocarboxamida. En un estudio anterior, ya hemos comprobado las posibilidades de monómeros de L-cisteína, tionina y o-fenilen-diamina, que en ciertas condiciones de electropolimerización forman oligómeros con un gran número de grupos funcionales tiol y amino, capaces de retener fuertemente a AgNPs [(28)]. En este trabajo, proponemos la caracterización analítica de nuevos monómeros, no estudiados hasta la fecha para esta finalidad. Los resultados de estos sensores se han comparado con electrodos voltamétricos no modificados, empleando la técnica de **voltametría de nanopartículas inmovilizadas**.

2. Experimental

2.1 Reactivos y disoluciones

Las disoluciones de monómeros utilizadas fueron L-Lisina (CAS Number: 56-87-1, PubChem Substance ID: 24896404, Sigma-Aldrich Química, S.L., Madrid, España) y Tiofeno-3-tiocarboxamida (PubChem Substance ID 329778571, Sigma-Aldrich Química, S.L., Madrid, España). Ambas disoluciones deben guardarse en nevera y protegidas de la luz para favorecer su conservación y manipularlas con precaución, debido a su toxicidad.

El electrolito soporte fue NaClO₄ 0,1 M. Se utilizó también una disolución tampon fosfato salino (PBS) mezclando H₂PO₄⁻ Y HPO₄²⁻ en proporción adecuada para conseguir un pH 9,0.

Todos estos reactivos generales se encontraban en el laboratorio (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Las disoluciones utilizadas en los ensayos de Ag^+ eran disoluciones de AgNO_3 preparadas en el laboratorio *in situ*. Sin embargo, las dispersiones patrón de AgNPs de diferentes concentraciones y tamaños, estaban ya preparadas en la nevera. Estas dispersiones se sometieron siempre a una homogeneización en baño de ultrasonidos (2-3 minutos) previamente a su utilización. Es importante guardar todas las disoluciones y dispersiones de plata y de AgNPs en nevera ($2-8\text{ }^\circ\text{C}$), y protegidas de la luz, para evitar su oxidación y deterioro. La dispersión de nanopartículas de plata más utilizada fue la de tamaño 40 nm de diámetro, concentración 0,02 mg/mL.

2.2 Instrumentación

Potenciómetro μ Autolab FRAD2 TYPE III (Metrohm Autolab B.V. Kanaalweg 29/G 3526 KM, Utrecht The Netherlands), con el software de control instrumental y adquisición de datos de Methrom NOVA (v.2.1.3).



Figura 1. Potenciómetro μ Autolab FRAD2 TYPE III empleado en las medidas voltamétricas de este trabajo.

La sensibilidad de medida de corriente es de $\pm 1\text{ nA}$ con una impedancia de entrada de $10^{12}\text{ }\Omega$ y una resolución en la aplicación de potencial de $\pm 1\text{ mV}$.

Se pueden medir diferentes técnicas voltamétricas (voltametría cíclica, voltametría de pulso diferencial voltametría de redissolución, cronoamperometría, cronoculombimetría, espectroscopía de impedancia electrónica y técnicas voltamétricas impulsionales).

Se utilizaron tres electrodos para corregir la caída óhmica. Electrodos de trabajo de carbón vítreo (*glassy-carbon*, GC), de oro (Au) y de platino (Pt), electrodo de referencia utilizado Ag/AgCl (vidrio vycor) y puente salino, y electrodo auxiliar hilo de platino (BioAnalytical Systems West Lafayette, IN 47906 USA).

Balanzas de precisión Mettler ($\pm 0,1\text{ mg}$), baño de ultrasonidos de potencia 260 W (P Selecta, Barcelona, España), material de vidrio aforado, micropipetas y material de laboratorio básico (Diferentes casas comerciales, Bomex, Hysil).

2.3 Procedimientos Experimentales

2.3.1 Preparación de los electrodos

En primer lugar se llevó a cabo una limpieza del material y de los electrodos. Para la limpieza del electrodo de trabajo GC se lava con HNO_3 diluido y agua miliQ, y posteriormente se pulen con polvo de alúmina ($0,05\ \mu\text{m}$) y polvo de diamante, eliminando así los restos de Ag, oligómero, u otras posibles interferencias. El electrodo de referencia así como el auxiliar y la celda se lava con HNO_3 diluido. No es aconsejable el uso de HNO_3 concentrado pues produce el deterioro del *glassy-carbon*. [(30)]

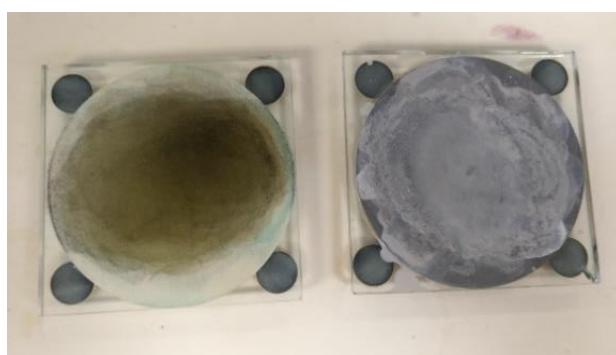


Figura 2. Material empleado para el pulido del electrodo de trabajo GC. Polvo de diamante sobre nylon (izda.) y alúmina sobre (dcha.)

2.3.2 Electropolimerización de la L-Lisina

Después de lavar y pulir el ET (sección 2.3.1), se procedió a realizar la electropolimerización de la L-Lisina sobre su superficie. Para ello se preparó una disolución de tampon PBS (pH 9,0) que contiene 10 mM de L-Lisina en agua miliQ en un matraz aforado de 25 mL. A continuación se desoxigenó la disolución saturando con una corriente de N_2 gaseoso para evitar la presencia de oxígeno (aire), electroactivo en los potenciales empleados.

La electropolimerización se realizó mediante voltametría cíclica entre -1,0 y +2,0 V, empleando 5 ciclos de potencial a una velocidad de barrido de 100 mV/s. [(29)]

Una vez llevada a cabo la electropolimerización se observó visualmente el electrodo de carbón vítreo modificado, una vez formada en su superficie una película adsorbida de polímero, con capacidad de retención de las nanopartículas de plata.

2.3.3 Electropolimerización del Tiofeno-3-tiocarboxamida

Después de la limpieza y preparación de los electrodos (sección 2.3.1), la electropolimerización del tiofeno-3-tiocarboxamida (PTPh) sobre la superficie del electrodo de trabajo GC se realizó a partir de una disolución no acuosa 6 mM de PTPh en acetonitrilo y con NaClO_4 0,1 M como electrolito, dado que es insoluble en agua. Pesamos 8,6 mg y los llevamos a un matraz de 10 mL que contenía 0,14046 g de NaClO_4 (0,1 M), enrasando con acetonitrilo.

Se desoxigenó la disolución de monómero para eliminar posibles interferencias de aire (oxígeno) disuelto, y se procedió a la electropolimerización mediante voltametría cíclica, con un barrido cíclico entre -1,0 y +1,6 V a una velocidad de 100 mV/s, durante n=15 ciclos.

2.3.4 Cuantificación de las AgNPs con electrodos modificados y no modificados

La cuantificación de las AgNPs (fig.5) se realiza mediante voltametría diferencial de pulsos (DPV), una de las técnicas voltamétricas más sensibles. Las condiciones instrumentales fueron: barrido anódico desde -0,2 a +0,5 V; potencial de paso $\Delta E=2\text{mV}$; incremento del pulso $\Delta E_p=25\text{ mV}$; duración del pulso $t_p= 50\text{ ms}$; velocidad de barrido de potenciales $v_{bp}=50\text{ mV/s}$. La cuantificación de Ag^+ se realizó con las mismas condiciones, excepto en un barrido en sentido catódico (desde +0,5 a -0,2V).

En todos los casos se realizaron ensayos de disoluciones blanco (en ausencia de plata), tanto en sentido anódico como catódico, para comprobar las bajas intensidades residuales de los voltágrafos en ausencia de AgNPs y Ag^+ .

Los voltágrafos de los blancos se realizaron en $\text{NaClO}_4 0,1\text{ M}$ con los ET modificados (secciones 2.3.2 y 2.3.3) o no modificados. Esto es importante, ya que a veces aparecen picos voltamétricos correspondientes a restos de monómeros (no electropolimerizados), y sirve para comprobar una buena limpieza sin restos de contaminación de plata. Para evitar esta contaminación, antes de cada ensayo es preciso lavar todo el material con HNO_3 diluido (sección 2.3.1). En el siguiente voltágrafo (fig.3) se muestra un blanco típico, sin los picos máximos de la plata que aparecen alrededor de 0,2 -0,3 mV.

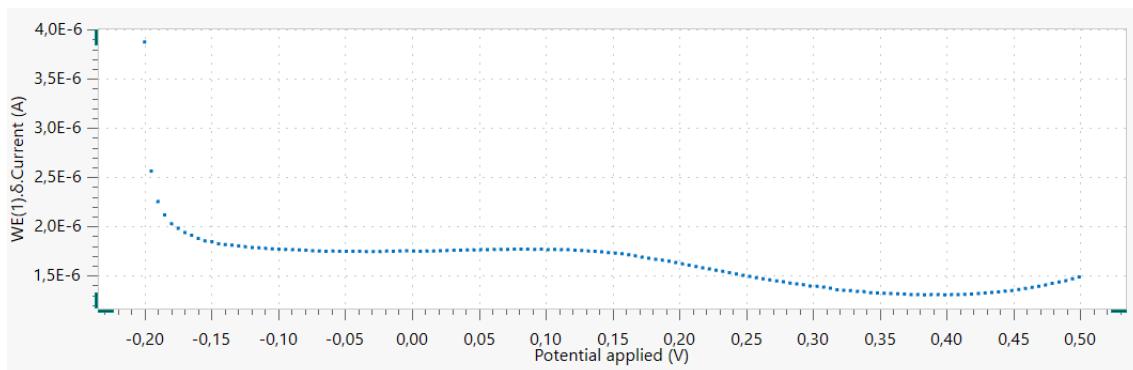


Figura 3. Voltágrafo típico de un electrodo modificado con PLL en una disolución blanco ($\text{NaClO}_4, 0,1\text{ M}$), en ausencia de plata. Velocidad de barrido de potenciales: 50 mV/s (DPV).

Las condiciones instrumentales de las medidas DPV para los blancos fueron las mismas que para la cuantificación de las AgNPs. El sentido anódico del barrido de potenciales se empleó para la cuantificación de las AgNPs, mientras que para la cuantificación de la Ag^+ se empleó el mismo barrido en sentido catódico (reducción electroquímica).

Estos dos tipos de barridos en ambos sentidos nos permitieron diferenciar y detectar separadamente plata iónica de plata metálica. Por ejemplo, para detectar si las AgNPs se han

oxidado previamente de forma química en lugar de electroquímica. Las disoluciones de Ag⁺ se prepararon a partir de AgNO₃.

Las dispersiones de AgNPs (10 μL) se colocaron sobre el electrodo de trabajo modificado (o sin modificar) para su retención selectiva, y se secó pasando corriente de N₂ (o de Argón) durante 5 min. En todos los casos, las dispersiones de AgNPs se sometieron a un baño de ultrasonidos para su homogeneización previamente a su utilización y para mejorar la reproducibilidad de las medidas.



Figura 4. Dispersiones de AgNPs de concentraciones (de izda. a dcha.) 2,5; 5; 10 y 20 ppm, en una calibración típica.

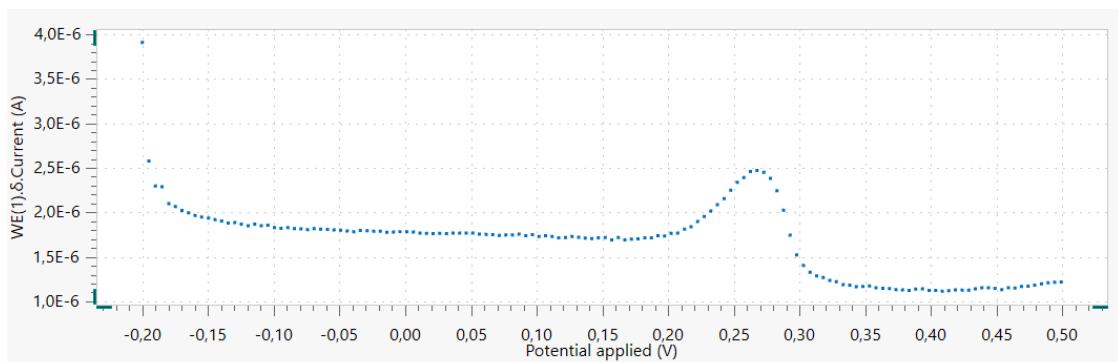


Figura 5. Voltamgrama típico de un electrodo modificado con PLL en una disolución (NaClO₄, 0,1 M), con AgNPs (20 ppm). Velocidad de barrido de potenciales: 50 mV/s (DPV). Barrido anódico de -0,2 a +0,5 V.

3. Resultados y discusión

3.1 Electrodo modificado L-Lisina

Se diseñó un biosensor a través de un electrodo de trabajo glassy-carbon modificado con una película de poli-L-Lisina la cual se consiguió electropolimerizando monómeros de L-lisina mediante voltametría cíclica (CV). El objetivo de este experimento era encontrar un sensor selectivo y sensible para la determinación y cuantificación de las nanopartículas de plata.

La L-lisina es un aminoácido esencial cuya fórmula es C₆H₁₄N₂O₂ con un peso molecular de 146,19 g/mol. Su nombre según la IUPAC es (S)-ácido 2,6-diaminohexanoico y químicamente actúa como base puesto que contiene grupos amino en su estructura los cuales pueden ser protonados.

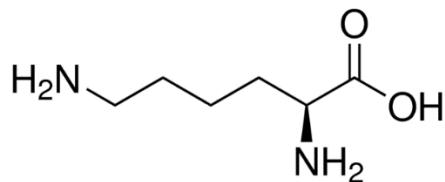


Figura 6. Molécula de L-lisina

Es uno de los aminoácidos vitales, fundamental en las reacciones bioquímicas de nuestro organismo entre los que destaca la disminución de los niveles de colesterol.

La electropolimerización de la L-lisina (Fig.7) para formar poli-(L-lisina) ha sido muy empleada recientemente para el entrampamiento de biomoléculas, debido a su buena biocompatibilidad, en la fabricación de biosensores electroquímicos [(24)]. El monómero es fácilmente soluble en agua, y en forma polimerizada contiene un gran número de grupos amino orientados externamente (Fig. 2), que *a priori* pueden ser buenos candidatos a complejarse a las AgNPs metálicas.

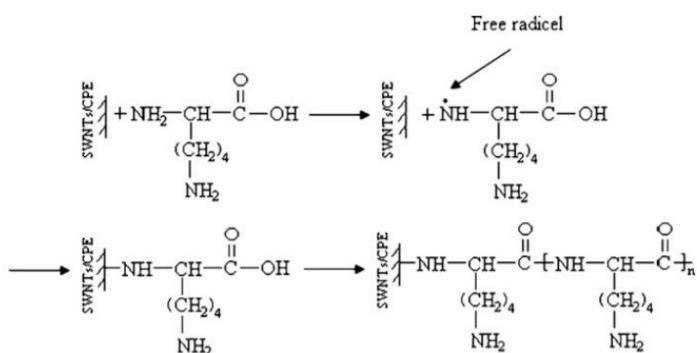


Figura 7. Mecanismo de electropolimerización de la L-Lys y disposición una vez unidos al electrodo glassy-carbon.

La inmovilización de las nanopartículas de plata sobre el electrodo se llevó a cabo gracias a la polimerización del monómero L-lisina, el cual forma un polímero adsorbido en la superficie del electrodo que facilita la retención de las AgNPs. Si bien los monómeros se unen formando un grupo amida, el radical sobre el grupo amino también ataca inicialmente al carbono, formando un enlace -C-N que inmoviliza de esta forma al oligómero de PLL (poly-lisina).

La electropolimerización de la L-Lisina se vio afectada por el número de ciclos, la velocidad y la concentración de barrido. Por lo que optimizamos el procedimiento para la máxima efectividad en el uso indicado.

Se observó una corriente de oxidación a +1.6 V, al hacer el barrido anódico y una corriente de reducción a -0,4 V cuando hacemos el barrido catódico, tal y como se muestra en la fig. 8. [(29)]

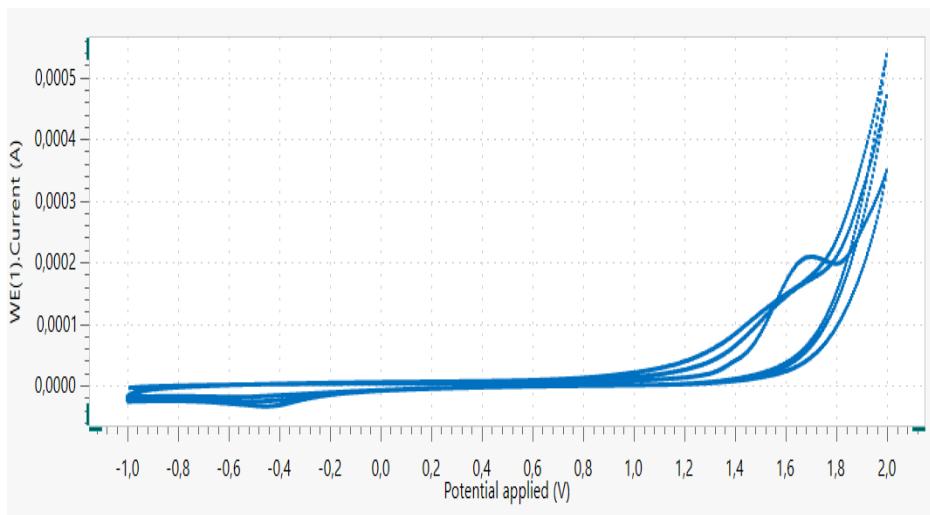


Figura 8. Voltagrama típico de la electropolymerización L-Lys mediante CV entre - 1,0 y + 2,0 V a una velocidad 100 mV/s (n=5 ciclos).

Conforme tenía lugar la electropolymerización el pico a +1,6 V iba disminuyendo, lo que indicaba cada vez una menor formación del oligómero por la saturación de la superficie del electrodo de trabajo (y un aumento de su resistencia eléctrica).

Una vez optimizados los parámetros de la electropolymerización, las propiedades más idóneas (capacidad de retención) y mayor estabilidad del polímero se obtuvieron por voltametría cíclica con 5 ciclos a 100 mv/s en un rango de potencial entre -1,0 y +2,0V.

Se observó que era necesario llegar a un potencial de +1,6 V para que comenzase la polimerización, como consecuencia de la formación de radicales libres sólo en estos potenciales muy altos. Sin embargo, la electrólisis con potenciales más altos de +2,0 V condujo a la sobre-oxidación de L-Lisina y al deterioro de la película de polímero, con la pérdida de sus propiedades de retención de AgNPs.

El monómero L-lisina se oxida para formar un radical libre de amino que puede unirse a la superficie del electrodo y formar películas de poli-L-lisina. El mecanismo es similar al muy estudiado comportamiento general de los aminoácidos. La película de PLL, así como la orientación de los grupos amino en gran número, favorece la retención de las nanopartículas de forma muy selectiva sobre otras superficies no modificadas, o incluso sobre otras nanopartículas (NPs), como por ejemplo NPs orgánicas (fullereno, nanotubos de carbono) o de otros metales, como Cerio.

Para comprobar la capacidad de retención, se realizaron experiencias tanto de AgNPs como de plata iónica Ag^+ . En un primer lugar se realizaron estudios con AgNO_3 para determinar cuál era el potencial de reducción Ag^+/Ag .

Se empezaron haciendo ensayos con barridos de -1,0 a 0,6 V llegándose a ver dos picos (fig.9), uno de ellos correspondía al potencial buscado y el otro a los restos de monómero de L-Lisina el cual podría tener actividad electroquímica. Esta hipótesis se contrastó cuando se realizaba un DPV seguido a la CV de electropolymerización sin presencia de plata, aparecía un pico muy ancho en torno a valores muy lejanos del Ep (máximo de potencial del pico) de la plata.

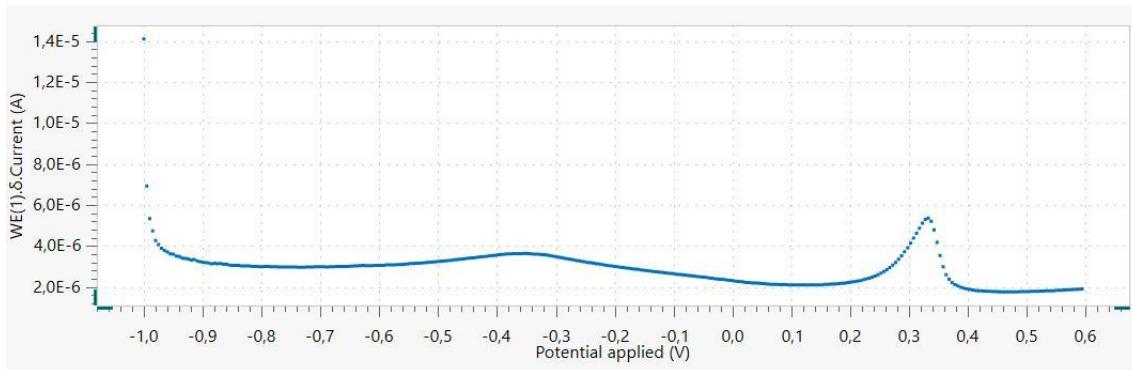


Figura 9. Voltamgrama típico con un electrodo modificado con PLL en una disolución NaClO₄ 0,1 M. Identificación del Ep correspondiente a AgNPs.

Con esta serie de ensayos se determinó que el potencial de reducción Ag⁺/Ag se encontraba en torno a 0,2- 0,3V, por lo que el siguiente paso fue acortar el barrido DPV, para evitar en lo posible la oxidación/reducción electroquímica de ambas especies, a potenciales alejados de éste Ep.

Se utilizó en diferentes ensayos un puente salino puesto que a elevadas concentraciones de Ag⁺ aparecía AgCl precipitado, el cual provenía de pequeñas pérdidas de la disolución saturada de cloruros del electrodo de referencia (normales, sobre el material poroso que permite el contacto eléctrico). Este inconveniente no se produce con las nanopartículas de plata, ya que las concentraciones de éstas eran mucho menores y no apareció ningún precipitado (no superando el producto de solubilidad).

La cuantificación de AgNPs se llevó a cabo mediante DPV con las condiciones comentadas en la sección 2.3.4. En un primer lugar se depositaba la gota de la dispersión de las nanopartículas sobre la superficie del electrodo y se secaba con una corriente gaseosa para que quedasen retenidas. Una vez retenidas se pasaba a determinar y cuantificar la concentración de las AgNPs, de forma secuencial.

En ensayos previos, se estudió la posibilidad de cuantificar las AgNPs a partir de una dispersión de las mismas, y sumergiendo el electrodo de trabajo modificado un tiempo controlado (del orden de 1-20 minutos). Si bien esta forma de trabajo dio buenos resultados, y las AgNPs se quedaron retenidas sobre el ET, este procedimiento presentó dos desventajas importantes con respecto al procedimiento optimizado, como fueron los mucho mayores volúmenes de muestra necesarios, y el mayor tiempo preciso para el depósito de las AgNPs sobre el electrodo.

Una vez optimizadas las condiciones experimentales de electropolimerización y de cuantificación de las NPs depositadas, se obtuvieron calibraciones sencillas que mostraron un comportamiento lineal entre las concentraciones de las AgNPs y las alturas y áreas de los picos voltamétricos DPV debidos a éstas NPs, para un mismo tamaño de las AgNPs (diámetro 40 nm.).

En la Tabla 1 se muestran los datos de un calibrado típico cuya ecuación de la recta, para el área del pico (unidades de $\cdot 10^{-8}$ Q) frente a la concentración de AgNPs (unidades de ppm) es $y = 0,4624x + 0,355$ y para la altura del pico (unidades de μ A) frente a la concentración de AgNPs (unidades de ppm) es $y = 0,1086x - 0,35$ ($R^2 = 0,9999$).

Siendo cada punto obtenido de la tabla el valor medio de dos medidas independientes.

Tabla 1. Cuantificación de AgNPs con un ET modificado con PLL

[AgNPs]	Ep (V)	i (μ A)	Área ($\cdot 10^{-8}$ Q)
5ppm	0,294	0,19	1,76
10ppm	0,304	0,74	6,34
20ppm	0,298	1,82	9,15

Es importante para obtener una buena reproducibilidad la integración del área de los picos siempre con una misma línea de base entre el potencial inicial y final del pico, a veces llevada a cabo de forma manual pues pueden variar ligeramente los potenciales Ep debido a distintas resistencias del polímero formado, que son dependiente sobre todo de su espesor.

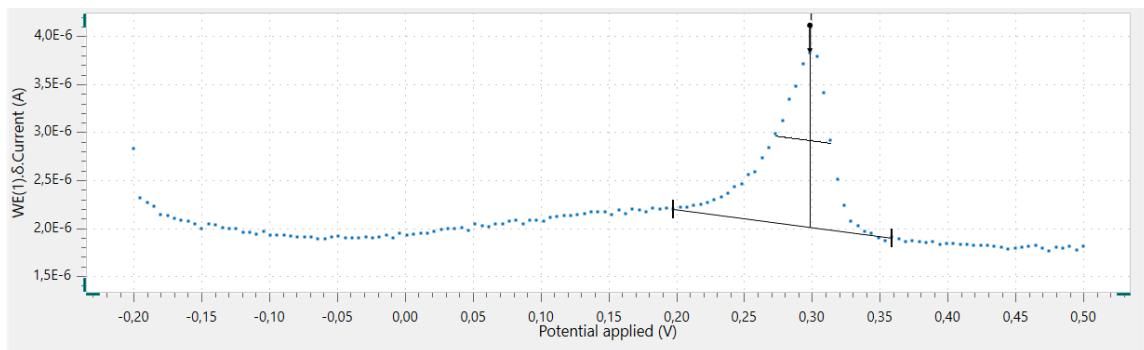


Figura 10. Voltamgrama típico de un electrodo modificado con PLL en una disolución (NaClO_4 , 0,1 M), con AgNPs (40 nm diámetro) de concentración 20 ppm. Velocidad de barrido de potenciales: 50 mV/s (DPV). Barrido anódico de -0,2 a +0,5 V.

El área y la altura del pico son proporcionales al número de moles que nanopartículas de plata oxidadas. Estas condiciones son selectivas a la determinación de Ag con estado de oxidación 0, no a Ag^+ ya que son condiciones de oxidación, por lo que este método nos permite diferenciar entre AgNPs o Ag^+ . En algunos casos, se observaron iones Ag^+ como consecuencia de oxidaciones de tipo químico (no electroquímico) a partir de AgNPs, por lo que es necesario extremar las precauciones para no modificar la composición de las muestras medidas (por ejemplo, empleando disoluciones saturadas de N_2 para evitar la oxidación del oxígeno disuelto).

A pequeñas concentraciones de nanopartículas de plata se observaban picos estrechos lo que significaba una rápida velocidad de transferencia de carga, conforme se aumentaba la concentración el pico era más ancho. Este comportamiento muy probablemente es debido a la energía potencial necesaria para la desadsorción de las AgNPs del polímero, previa a su oxidación electroquímica. Ensayos previos con otros tipos de NPs (AuNPs, CeO_2 NPs) mostraron también picos voltamétricos, aunque a potenciales (energías potenciales) distintos, y de menor sensibilidad.

Otro parámetro de calidad analítica, además de la sensibilidad y selectividad, es la reproducibilidad del procedimiento. Sin embargo, una dificultad en la repetición de medidas es la lenta degradación del polímero, que influye en su capacidad de retención y en las propiedades analíticas de las medidas realizadas. Aproximadamente, los picos voltamétricos disminuyeron

alrededor de un 8% al realizar 5 medidas consecutivas (20 ppm) con un mismo PLL, lo que hace necesaria la renovación de la capa de PLL sobre el electrodo. No obstante, la limpieza y modificación por electropolimerización de un nuevo electrodo se realiza en un tiempo corto (cada 3 medidas consecutivas aproximadamente).

Llevando a cabo sucesivas electropolimerizaciones ($n=3$) sobre un mismo electrodo GC, la reproducibilidad para la determinación de AgNPs fue buena, con desviaciones estándar relativas menores del 5%, aproximadamente).

En cuanto a ensayos de reproducibilidad se vio que al realizar un número elevado de barridos la película de polímero se iba deteriorando, y no retenía tan bien las nanopartículas. En la siguiente tabla podemos observar la bajada de señal a medida que se va perdiendo plata retenida conforme se realizan barridos consecutivos (misma retención).

Tabla 2. Reproducibilidad. Medidas consecutivas DPV con ET modificado con PLL, misma retención AgNPs (20 ppm, 40 nm de diámetro).

[AgNPs]	E_p (V)	i (μ A)	Área ($\cdot 10^{-8}$ Q)
20ppm	0,298	1,820	9,15
20ppm	0,288	0,924	6,11
20ppm	0,262	0,378	2,34

Se consideraron aceptables resultados de hasta 3 medidas consecutivas. Cuando el voltograma DPV era similar al voltograma del blanco se había eliminado toda la plata, así pues, se lavaba el material se cambiaba la disolución y se procedía a realizar más medidas. Concluyendo así que se podía llevar a cabo hasta 3 medidas para identificar la presencia de nuestro analito (AgNPs).

El hecho de que a la cuarta medida desapareciese el pico de plata quiere decir que la retención de las nanopartículas es buena. Como se verá más adelante, va a ser un factor clave en comparación con estudios con ET sin modificar.

Determinaciones con concentraciones muy pequeñas y en relación a los blancos, mostraron que el límite de cuantificación es 5ppm, pudiéndose alcanzar un límite de detección a 2,5ppm de AgNPs.

Se estudió la posible limpieza electroquímica del electrodo modificado realizando barridos de redisolución (ASV) de tal forma que las nanopartículas retenidas se oxidaban a Ag^+ y pasaban a la disolución.

Las condiciones de la ASV fueron mantener un potencial de + 0,9 V (Ee) durante 10 minutos ($t_e=600$ s) y posterior un barrido anódico. El inconveniente de este proceso era el posterior deterioro del PLL por lo que se descartó este proceso de limpieza y se optó por realizar más de 4 medidas y esperar a que el voltograma coincidiese con el blanco, lo que confirma de que desaparece la totalidad de las AgNPs depositadas sobre el electrodo. También se consideró la opción de limpiar las AgNPs retenidas con HNO_3 diluido pero no era suficiente, seguía dando señal, es decir, el ácido nítrico no eliminaba todas las nanopartículas retenidas en el PLL.

Cabe destacar en esta sección la realización de estudios sobre la electropolimerización de la L-Lisina utilizando electrodos de trabajo de oro en lugar del GC. Esta variable fue eliminada puesto que en la realización de blancos aparecía una línea base poco regular (mucho ruido de fondo) lo cual es un inconveniente a la hora de identificar picos de pequeña ip dadas sus bajas concentraciones.

3.2 Electrodo modificado Tiofeno-3-carboxamida

El tiofeno-3-tiocarboxamida es un compuesto orgánico de fórmula molecular $C_5H_5NS_2$ con un peso molecular de 143,23 g/mol. Insoluble en agua pero soluble en disolventes orgánicos, de ahí que la preparación de la disolución para la electropolimerización usemos acetonitrilo en lugar de agua.

Esta muy estudiada la síntesis de poli-tiofenos (PTs) a partir de monómeros sustituidos en posición 3' o 2', estos se oxidan muy fácilmente a sulfonas, obteniéndose mezclas de politiofeno oxidado y sobreoxidado. El tiofeno es un monómero muy útil en electroanálisis, dadas las buenas propiedades del oligómero formado, adherencia a la superficie del electrodo y por su buena conductividad electrónica a través de electrones π conjugados (hibridación electrónica sp²).

La formación de un radical de tiofeno a potenciales muy oxidantes produce inicialmente el dopado con el anión empleado como electrolito soporte, y posteriormente forma la cadena polimérica con la pérdida de este anión dopado (Fig. 11). Si bien la electropolimerización podría realizarse a un potencial anódico (oxidante) elevado constante, obtuvimos mejores resultados mediante un barrido (cíclico) de potenciales, dando lugar más fácilmente al proceso de dopado-undopado y obteniendo un polímero más uniforme y con mayor conjugación de electrones π .

Elegimos el tiofeno derivatizado en posición C3' (en lugar del mismo monómero derivatizado en posición C2'), pues de esta forma los grupos sulfuro y amino se encontraban orientados más hacia el exterior con respecto a la cadena de poli-tiofeno, y *a priori* esto facilitaría la atracción de las AgNPs (o facilitaría el complejamiento de los iones Ag^+), mejorando así su capacidad de retención de la plata.

No existen, hasta nuestro conocimiento, referencias bibliográficas en la literatura científica que hayan descrito la electropolimerización del tiofeno-3-tiocarboxamida. Por lo que buena parte del trabajo experimental lo dedicamos a la prueba de concepto de que su electropolimerización se producía sobre el electrodo GC, y posterior optimización y mejora de esta síntesis.

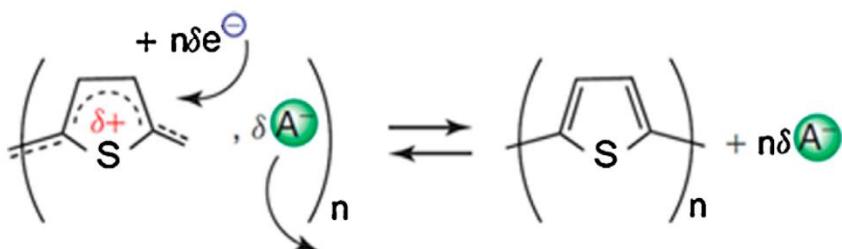


Figura 11. Mecanismo de electropolimerización del poli-tiofeno; dopado con un anión electrolito soporte y posterior electro-neutralización a través de una oxidación electroquímica.

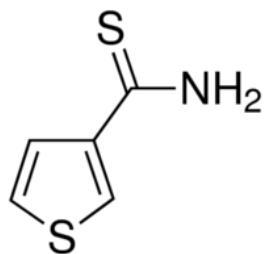


Figura 12. Monómero de tiofeno-3-tiocarboxamida, estudiado como monómero para su polimerización electroquímica.

La electropolimerización del tiofeno-3-tiocarboxamida (PTPh) se ensayó inicialmente a un potencial constante ($E_e=+1,5$ V.), observándose una corriente que disminuía con el tiempo, lo que podía significar la formación de capas de poli-tiofeno (PTh) sobre el electrodo de trabajo. No obstante, se obtuvieron polímeros con mucha mejor capacidad de retener a las AgNPs mediante un barrido cíclico, y con el mecanismo de dopado-undopado explicado. Esto corroboraba lo que publican otros autores sobre poli-tiofenos sin derivatizar. También se realizaron ensayos previos con tiofeno sin derivatizar con la carboxamida, y se vió su casi nula capacidad de retener a la Ag^+ , a pesar del grupo sulfuro, seguramente debido a su posición en la cadena polimérica o de impedimento estérico. En todos los casos, el oligómero formado es insoluble en agua y quedó fuertemente adherido a la superficie del GC, como pudo observarse a simple vista.

Los polímeros con mejores propiedades se obtuvieron mediante un barrido cíclico entre -1,0 y +1,6 V, durante 15 ciclos a una velocidad de 100 mV/s. Se observaron dos picos como podemos ver en el siguiente voltágrafo (Fig. 13). Estos picos de corriente iban disminuyendo a medida que aumentaba el número de ciclos de barrido de potencial, lo que confirma la formación de capas sucesivas del polímero cada vez de mayor espesor.

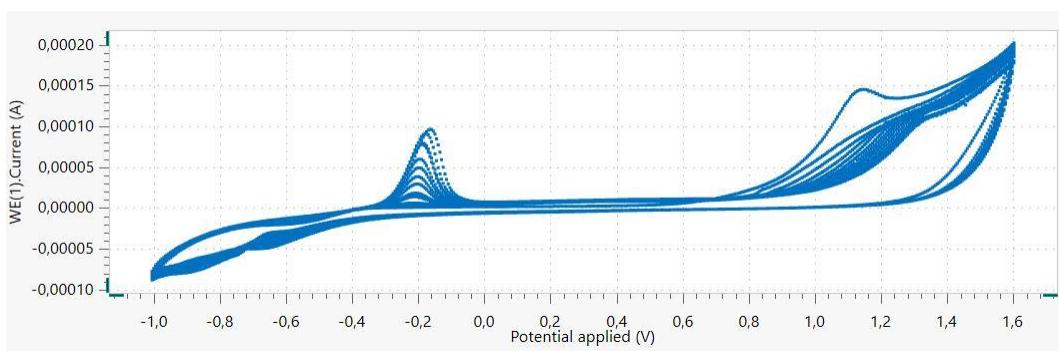


Figura 13. Voltágrafo típico de la electropolimerización de PTPh (6 mM) mediante CV entre -1,0 y +1,6 V. Durante 15 ciclos; velocidad de barrido 50 mV/s

Una vez modificado el electrodo de trabajo, las primeras experiencias las realizamos con iones Ag^+ (AgNO_3), previamente al estudio de las AgNPs.

Se realizaron ensayos con una dispersión de AgNPs de concentración de 20ppm con un tamaño de 40nm. Los resultados fueron los siguientes, realizando 4 medidas consecutivas de las mismas AgNPs retenidas sobre el electrodo modificado.

Tabla 3. Cuantificación de AgNPs con un ET modificado con PTPh

[AgNPs]	Ep (V)	i (μ A)	Área ($\cdot 10^{-8}$ Q)
20ppm	0,2783	1,25	3,61
	0,2783	1,16	2,86
	0,2783	0,820	2,06
	0,2582	0,339	0,58

Estos resultados se obtuvieron siguiendo la sección 2.3.4 para cuantificar AgNPs. Una vez modificado el ET con PTPh se depositaban 10 μ L de dispersión AgNPs (40 nm de diámetro) de una concentración de 20 ppm y se hacía pasar una corriente de N₂ gaseoso durante 5 minutos. A continuación el ET modificado con las nanopartículas retenidas se introducía en una disolución electrolito soporte (NaClO₄ 0,1 M) y se procedía a cuantificar mediante DPV barrido anódico de -0,2 a +0,5 V a una velocidad de barrido de 50 mV/s.

Como se puede observar en la tabla 3, a medida que se realizaban medidas voltamétricas disminuía tanto la intensidad del pico como el área. Esto se debe a que conforme se realiza el barrido anódico DPV se produce la oxidación de las nanopartículas de plata, pasando de estado de oxidación 0 a +1, y probablemente su pérdida en la disolución de las medidas voltamétricas. Para conocer el número de moles que se oxidaban en cada medida de la tabla se puede utilizar la Ley de Faraday (Ec.1), midiendo el área del pico voltamétrico (para el dominio de tiempo correspondiente a la velocidad del barrido de potenciales).

$$\text{Moles AgNPs} = \frac{Q}{1 \cdot 96500}$$

Ecuación 1. Ley de Faraday. Cálculo del número de moles de AgNPs oxidados.

El voltágrafo debido a las AgNPs que se obtuvo es el siguiente (Fig. 14). En el mismo se puede apreciar un pico menor en comparación con los correspondientes con PLL. Lo que significa que se obtuvo una menor sensibilidad para la determinación de AgNPs utilizando un ET modificado con Tiofeno-3-tiocarboxamida comparando con electrodo GC modificado con polímero de L-lisina.

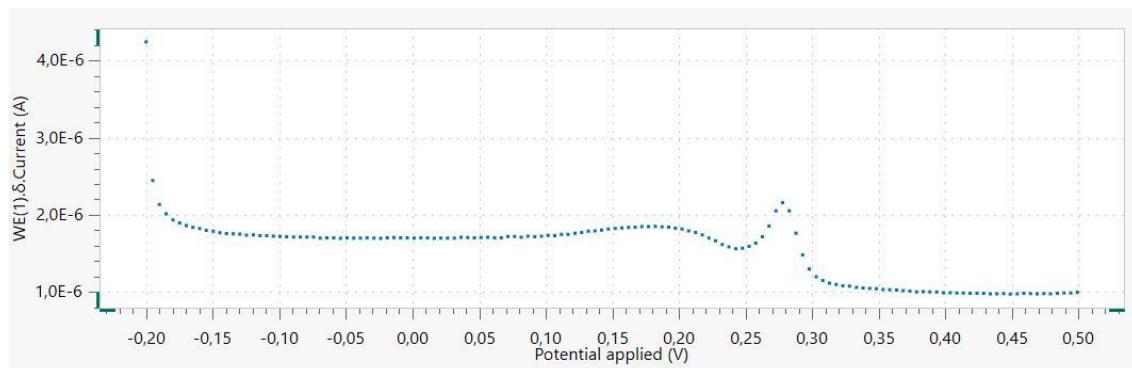


Figura 14. Voltágrafo típico de un electrodo modificado con PTPh en una disolución (NaClO₄, 0,1 M), con AgNPs (40 nm diámetro) de concentración 20 ppm. Velocidad de barrido de potenciales: 50 mV/s (DPV). Barrido anódico de -0,2 a +0,5 V.

Se observó que el pico que se obtenía de AgNPs a bajas concentraciones, desaparecía más rápidamente en comparación con el electrodo con PLL, esto puede deberse a que las nanopartículas se oxidasen químicamente en presencia de los sulfuros del monómero, al formarse una especie muy estable (AgS).

Para comprobar esta hipótesis se mantuvo un potencial lo suficientemente negativo para reducir toda la plata Ag^+ (AgS) a Ag^0 , y posteriormente se realizó un análisis por voltametría de redissolución anódica. Efectivamente, se comprobó que parte de las AgNPs son oxidadas a Ag^+ una vez retenidas, debido a la formación química de sulfuro de Ag(I), favorecida por los potenciales electroquímicos empleados en la determinación de las AgNPs.

Por lo tanto, con este polímero el procedimiento de cuantificación de las AgNPs debe de realizarse mediante voltametría de redissolución: una vez retenidas las AgNPs (y parcialmente oxidadas a Ag^+ , en una primera etapa de pre-electrolisis ($E_{\text{e}}=-0,9 \text{ V}$) se transformó toda la plata a $\text{Ag}(0)$. Posteriormente, y después de una etapa de reposo (120 s), en la tercera etapa de redissolución toda la $\text{Ag}(0)$ es oxidada mediante un barrido DPV obteniéndose un voltágrafo de redissolución a Ag^+ como el representado en la Fig. 15.

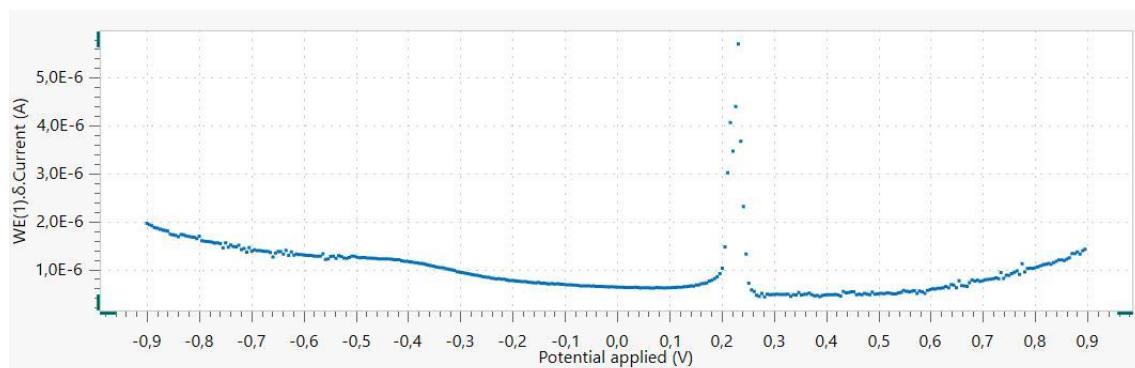


Figura 15. Voltágrafo típico de un electrodo modificado con PTPPh en una disolución (NaClO_4 , 0,1 M), con AgNPs (40 nm diámetro) de concentración 20 ppm. Voltametría de redissolución (ASV) $E_{\text{e}}= -0,9 \text{ V}$ (120 s) y DPV anódico de -0,2 a +0,5 V a 50 mV/s.

De esta manera, se confirmó la posibilidad de cuantificar AgNPs con este polímero como prueba de concepto, abriendo una nueva línea de investigación que nos parece muy interesante, y que, lógicamente, requiere de un estudio experimental más extenso que el que corresponde a este trabajo Fin de Grado.

3.3 Electrodo sin modificar

Los resultados estudiados con electrodos modificados, para la cuantificación de las AgNPs, se compararon analíticamente con electrodo de trabajo (ET) GC sin modificar (*bare GC electrode*).

En un primer lugar se realizaron medidas utilizando AgNO_3 , comprobándose así que el potencial de reducción de la plata seguía apareciendo en el rango esperado. Posteriormente se pasó a realizar los ensayos con AgNPs.

Una vez preparados los electrodos y limpiado todo el material (sección 2.3.1), se realizaron ensayos con AgNPs de diferentes concentraciones, tras comprobar los correspondientes blancos. Para ello, el electrodo sin modificar se depositaba sobre de la dispersión de nanopartículas de concentración deseada, con un tiempo de retención de 10 minutos, a continuación manteniendo la misma disolución electrolito soporte que en los estudios con ET modificados (NaClO_4 0,1M), se procedió a realizar una determinación voltamétrica DPV.

Las condiciones instrumentales óptimas para esta cuantificación fueron las indicadas en la sección 2.3.4, un barrido anódico desde -0,2 a +0,5 V a una velocidad de barrido de 50mV/s. Los resultados con nanopartículas de plata de 40 nm de diámetro para diferentes concentraciones fueron las que se muestran en la siguiente tabla 4.

Tabla 4. Cuantificación de AgNPs con un ET no modificado.

[AgNPs]	E_p (V)	i (μA)	Área ($\cdot 10^{-8}\text{Q}$)
2,5 ppm	-	-	-
5 ppm	-	-	-
10ppm	0,3035	0,217	1,32
20ppm	0,30853	0,483	2,81

La mínima concentración de nanopartículas de plata que se pudo cuantificar fue 10 ppm, presentando una altura de pico de $2,17 \cdot 10^{-7} \text{ A}$ y un área de $1,32 \cdot 10^{-8} \text{ Q}$. Con concentraciones inferiores el resultado fue un voltágrafo similar a la línea base, sin pico de AgNPs.

A diferencia de los electrodos modificados, se observó una muy pequeña capacidad de retención de las AgNPs. Una vez realizada la primera medida voltamétrica DPV, en el voltágrafo siguiente ya no se observaron picos anódicos debidos a la presencia de Ag(0), es decir, se oxidaban todas las nanopartículas retenidas en la primera medida. A diferencia de los ET modificados con polímero, que podían llegar a detectar AgNPs hasta 3 barridos consecutivos. Además, basta una simple limpieza con ácido nítrico diluido (1:10) para limpiar de plata completamente el electrodo de GC.

La altura del pico es proporcional a la concentración de nanopartículas de plata, conforme se aumenta la concentración aumenta la altura del pico y su área. Este aumento sigue un comportamiento lineal, ajustándose a una ecuación de primer grado (R alrededor de 0,9900).

A través del área de los picos se calculó el número de moles que se han oxidado (Tabla 5) mediante la equivalencia de Faraday, donde el número de moles de AgNPs es igual a la carga entre el número de oxidación por la constante de Faraday (E_{c1}). El número de moles que se oxidan en la superficie del electrodo de trabajo sin modificar aumenta conforme aumenta la concentración de AgNPs.

Al aumentar la concentración de AgNPs se vio que se pasaba de picos más estrechos a picos más anchos, lo que significa que con concentraciones menores, la velocidad de transferencia de carga era muy rápida, como puede verse en los siguientes voltágrafos (Figs. 16 y 17).

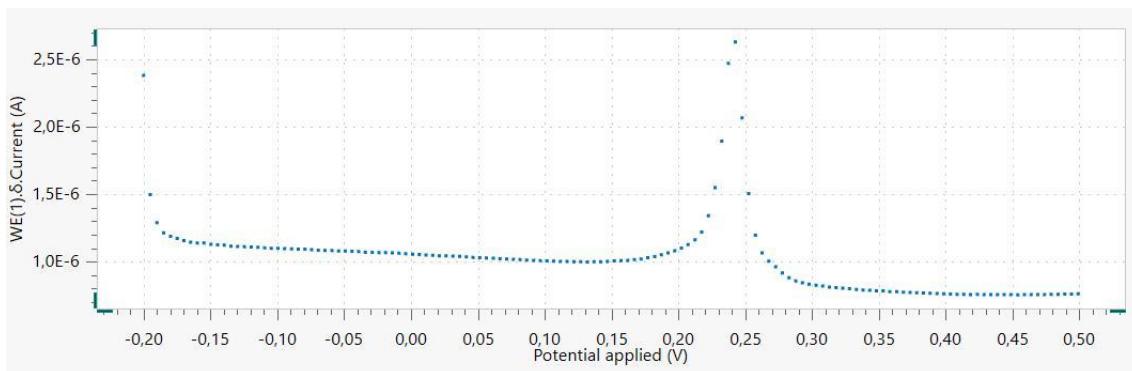


Figura 16. Voltágrafo típico de un electrodo no modificado en una disolución (NaClO_4 , 0,1 M), con AgNPs (40 nm diámetro) de concentración 2,5 ppm. Velocidad de barrido de potenciales: 50 mV/s (DPV). Barrido anódico de -0,2 a +0,5 V.

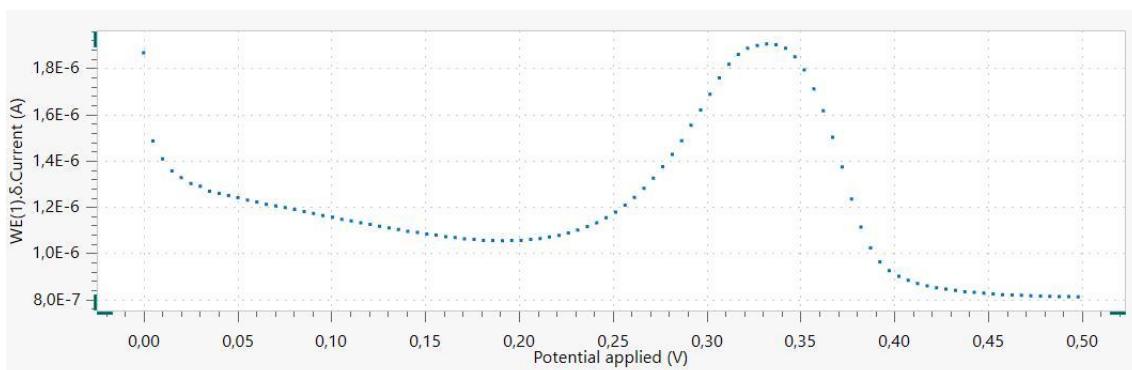


Figura 17. Voltágrafo típico de un electrodo no modificado en una disolución (NaClO_4 , 0,1 M), con AgNPs (40 nm diámetro) de concentración 20 ppm. Velocidad de barrido de potenciales: 50 mV/s (DPV). Barrido anódico de -0,2 a +0,5 V.

La selectividad del electrodo para cuantificar AgNPs se debe a que los valores de E_p son distintos a los de otras NPs metálicas, como por ejemplo las de oro, las cuales son también muy empleadas y podrían interferir si estuvieran en la misma muestra que las AgNPs. En experiencias previas, las AuNPs producen picos en voltametría de redisolución adsorptiva con potenciales de máximo (E_p) muy distintos a los de las AgNPs.

También es importante destacar la selectividad para cuantificar Ag^0 realizando un barrido anódico en el cual se oxidan las nanopartículas de plata y no cuantificar Ag^+ . Se aseguraba que la celda no contenía Ag^+ al realizar un blanco DPV en sentido catódico puesto que no aparecía pico. En conclusión, el procedimiento que se ha desarrollado en este trabajo permite diferenciar voltamétricamente entre plata iónica y plata metálica muy fácilmente.

Para poder comparar los resultados obtenidos con aquellos de los ET modificados, se estudió la determinación de AgNPs utilizando la misma técnica a la hora de depositar las nanopartículas, es decir, se depositan 10 μL de dispersión sobre la superficie del electrodo de trabajo y se hace pasar una corriente de N_2 gaseoso durante 5 minutos. Con las mismas condiciones de cuantificación de AgNPs (sección 2.3.4) se observó que con un ET bare se conseguían picos de

plata a concentración 20 ppm con $E_p = 0,337$ V, una intensidad de corriente $0,961 \mu\text{A}$ (altura del pico) y un área de $8,75 \cdot 10^{-8} \text{ Q}$.

También se pudo comprobar que el ET detectaba concentraciones de AgNPs menores que en los ensayos con ET modificados, siendo así el ET bare capaz de determinar nanopartículas de plata de 40 nm de concentración 2,5 ppm.

A continuación se muestra en la tabla 5, la comparación de tres ensayos con distinto electrodo de trabajo (ET modificado con PLL, ET modificado con PTPh y ET bare), utilizando las mismas condiciones de cuantificación de AgNPs.

Se utilizó una dispersión de nanopartículas de plata de tamaño 40 nm de concentración 20 ppm ($10 \mu\text{L}$ depositados) por lo que el número de moles de AgNPs retenidos es el mismo en las tres experiencias.

Tabla 5. Comparación de la cuantificación de AgNPs (40 nm, 20 ppm) utilizando mismas condiciones entre los distintos ET.

Electrodo de trabajo utilizado	i (μA)	Área ($\cdot 10^{-8} \text{ Q}$)	Moles AgNPs retenidos	Moles AgNPs oxidados	% de señal
ET PLL	1,82	9,15	1,85E-09	9,48E-12	0,511
ET PTPh	1,25	3,61	1,85E-09	3,74E-12	0,202
ET bare	0,961	8,75	1,85E-09	9,07E-12	0,489

Como se puede observar en la tabla, se obtiene una mayor señal al utilizar un electrodo de trabajo modificado con PLL, es decir, la sensibilidad es mayor en el caso de utilizar un ET modificado con poli-L-Lisina.

4. Conclusiones

A continuación se exponen las **conclusiones** más importantes de este trabajo.

1. Se han desarrollado nuevos procedimientos para la detección sensible de **nanopartículas de plata**, basados en **voltametría de nanopartículas inmovilizadas**. Las medidas voltamétricas se realizaron por barridos de potencial diferencial de pulsos, que permite la determinación de concentraciones del orden de los ppm's.
2. Se propone de forma novedosa la modificación de electrodos voltamétricos mediante procedimientos de **electropolimerización** de un monómero, que den lugar a polímeros adheridos a este electrodo que tengan capacidad de **retención de las AgNPs**. Para ello, se ha comprobado que son necesarios grupos funcionales (amino, sulfuro) que estén orientados hacia el exterior del polímero generado.
3. Se propone para su estudio y con esta finalidad el **monómero L-Lisina**, observándose su gran capacidad para retener a las AgNPs, y también a iones Ag^+ . Para ello, fue necesario optimizar las condiciones de electropolimerización, mediante un barrido cíclico (la utilización de potencial constante dio peores resultados en este sentido).

4. El polímero **poli(L-lisina)** proporcionó superficies del electrodo que permitieron la cuantificación de AgNPs con gran sensibilidad, selectividad y reproducibilidad. Si bien el polímero sobre el electrodo pierde sus propiedades después de varias medidas, la síntesis de una nueva capa de PLL se realiza de forma reproducible y en un tiempo pequeño.
5. Se ha estudiado por primera vez la electropolimerización del **monómero tiofeno-3-tiocarboxamida**, optimizando sus condiciones experimentales. Los voltáramos cíclicos obtenidos confirmaron que se van formando capas de oligómero, cuyo espesor puede controlarse fácilmente por el número de ciclos realizados. El polímero obtenido, de forma similar a otros derivados del tiofeno, tiene buenas propiedades conductoras.
6. Se ha demostrado que el derivado en **posición C3'** de la tiocarboxamida da lugar a oligómeros de poli-tiofeno capaces de **retener a nanopartículas de plata**, y también a iones de plata Ag^+ , que sirven para la detección y cuantificación tanto de las nanopartículas como de plata iónica, mediante voltametría de nanopartículas inmovilizadas. Si bien, también se comprobó que la capacidad de retención es menor que la del polímero PLL.
7. Se han comparado las propiedades analíticas de la cuantificación de AgNPs de ambos polímeros con las de electrodos de *glassy-carbon* sin modificar (*bare*), mediante la técnica de **nanopartículas inmovilizadas**. La mayor sensibilidad se obtuvo con electrodos PLL. Los polímeros proporcionan mayor selectividad que medidas directas sin polímero.
8. Las sensibilidades obtenidas permiten la **cuantificación de AgNPs** (diámetro 40 nm.) en concentraciones del orden de 5 ppm. Un aspecto muy importante es la diferenciación de iones Ag^+ de nanopartículas AgNPs, que en el futuro permitiría su especiación voltamétrica.
9. El objetivo del trabajo es la constatación como prueba de concepto del uso de electrodos polimerizados como superficies de reconocimiento de AgNPs que permitan su detección y cuantificación selectiva. El trabajo presentado no pretende el desarrollo y validación de procedimientos analíticos, pero sí ha establecido las bases para futuros y novedosos **sensores de AgNPs** de los que en la actualidad no se disponen. Estos sensores, permitirían esta cuantificación de forma muy rápida y sencilla.

5. Bibliografía

1. *Commission Recomendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial.* **The European Commission.** s.l. : <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:275:0038:0040:en:PDF>, 2011, Official J. of the European Union, Vols. L-275, pp. 38-40.
2. *Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples.* **Laborda, F. et al.** 2016, Vol. 904, pp. 10-32.
3. **The European Commission Joint Research Centre.** Development of options for changing REACH requirements for nanomaterials and assessment of their consequences for industry, consumer human health and the environment. [Online] 2013.
http://www.safenano.org/media/77095/SN%20Feature%20Article_Aschberger2013- Options.
4. *Determining nanomaterials in food.* **Blasco, C. et al.** 2011, TrAC Trends in Anal. Chem., Vol. 30, pp. 84-99.
5. *Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches.* **Zhang, X.F. et al.** 2016, Int. J. Molec. Sci., Vol. 17, pp. 1534-1558.
6. *Preparation of Silver Nanoparticles and Their Industrial and Biomedical Applications: A Comprehensive Review.* **Haider, A. et al.** 2015, Adv. Mat. Sci. Eng., Vols. ID-165257, pp. 1-16.
7. *Review: Issues of Silver Nanoparticles in Engineered Environmental.* **Siripattanakul, S. et al.** 2014, Water Air and Soil Pollution, Vol. 225, pp. 1-18.
8. *Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology.* **McGillicuddy, E. et al.** 2017, Sci. Total Environ., Vol. 575, pp. 231-246.
9. *Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles.* **Liu, J.F. et al.** 2012, TrAC Trends in Anal. Chem., Vol. 33, pp. 95-106.
10. *Nanostructured Sensors for Detection of Heavy Metals: A Review.* **Ming, L. et al.** 2013, Vol. 1, pp. 713-723.
11. *Anodic Stripping Voltammetry of Silver Nanoparticles: Aggregation Leads to Incomplete Stripping.* **Cloake, S. et al.** 2015, ChemistryOpen, Vol. 4, pp. 22-25.
12. *Direct electrochemical detection and sizing of silver nanoparticles in seawater media.* **Compton, R.G. et al.** 2013, Nanoscale, Vol. 5, pp. 174-177.
13. *Nanoparticle-Imprinted Matrices as Sensing Layers for Size-Selective Recognition of Silver Nanoparticles.* **Witt, J. et al.** 2016, ChemElectroChem, Vol. 3, pp. 2116-2124.
14. **Valcárcel, M.** *La Química Analítica, hoy y mañana.* s.l. : Universitat de Valencia, 2011. Vols. ISBN 978-84-370-8128-1.
15. *Modified Electrodes Used for Electrochemical Detection of Metal Ions in Environmental Analysis.* **March, G. et al.** 2015, Biosensors, pp. 242-275.
16. *Review - Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses.* **Bahadır, E.B. et al.** 2015, Anal. Biochem., Vol. 478, pp. 107-120. 107-120.

17. *Electrochemical sensing of heavy metal ions with inorganic, organic and bio-materials.* **Cui, L. et al.** 2015, Bios. Bioelectr., Vol. 63, pp. 276-286.
18. *Size-Dependent Electrochemical Oxidation of Silver Nanoparticles.* **Zamborini, F.P. et al.** 2010, J. Am. Chem. Soc., Vol. 132, pp. 70-72.
19. *A disposable sticky electrode for the detection of commercial silver NPs in seawater.* **Cheng, W. et al.** 2013, Nanotechnology, Vol. 24, pp. 505501-505507.
20. *Chemical interactions between silver nanoparticles and thiols: a comparison of mercaptohexanol against cysteine.* **Compton, R.G. et al.** 2014, Sci. China Chem., Vol. 57, pp. 1199-1210.
21. *Study of Metallothionein Modified Electrode Surface Behavior in the Presence of Heavy Metal Ions-Biosensor.* **Adam, V. et al.** 2005, Electroanal., Vol. 17, pp. 1649-1657.
22. *Recent advances in chemical functionalization of nanoparticles with biomolecules for analytical applications.* **Oh, J.H. et al.** 2015, Anal. Bioanal. Chem., Vol. 407, pp. 8627-8645.
23. *Recent advances in electropolymerized conducting polymers in amperometric biosensors. A review.* **Vidal, J.C. et al.** 2003, Microchim. Acta, Vol. 143, pp. 93-111.
24. *Electrochemical Impedance Spectroscopy Study on Polymerization of L-Lysine on Electrode Surface and Its Application for Immobilization and Detection of Suspension Cells.* **Huang, B. et al.** 2014, Anal. Chem., Vol. 86, pp. 6940-6969.
25. *Electrochemical DNA sensors based on electropolymerized materials.* **Budnikov, H.C. et al.** 2012, Talanta, Vol. 102, pp. 137-155.
26. *Amperometric cholesterol biosensors based on the electropolymerization of pyrrole and the electrocatalytic effect of Prussian-Blue layers helped with self-assembled monolayers.* **Vidal, J.C. et al.** 2004, Talanta, Vol. 64, pp. 655-664.
27. *Silver nanoparticle detection and characterization in silver colloidal products using screen printed electrodes.* **Cepriá, G. et al.** 2014, Anal. Meth., Vol. 6, pp. 3072-3078.
28. **Torrero, D. y Vidal, J.C.** *Diseño de un sensor de afinidad para la determinación de nanopartículas de plata en productos de consumo.* Química Analítica, Universidad de Zaragoza. 2017.
29. *A DNA electrochemical sensor with poly-L-lysine/single-walled carbon nanotubes films and its application for the highly sensitive EIS.* **Chen Jiang, Tao Yang, .** 2008, Electrochimica Acta, pp. 2917-2924.
30. **Bioanalytical Systems.** Electrode polishing and care.(User's manual). Kent Avenue West

Abreviaturas

- NPs Nanopartículas
AgNPs Nanopartículas de plata
DPV Voltametría diferencial de pulsos (differential-pulse voltammetry)
CV Voltametría cíclica (cyclic voltammetry)
ASV Voltametría de redisolución anódica
L-lys L-lisina
PTPh Tiofeno-3-tiocarboxamida
GC Carbon vítreo (glassy-carbon)
ET Electrodo de trabajo
EA Electrodo auxiliar
ER Electrodo de referencia
NMs Nanomateriales
UE Unión Europea
MIPs Polímeros modelados molecularmente
PBS Tampón fosfato salino (phosphate buffered saline)
Ep Potencial de pico
ip Intensidad de pico
PLL Poli-L-Lisina
PTs Politiofenos
TFG Trabajo de fin de grado
Ee Potencial de electrolisis
Te Tiempo de electrolisis
 ΔE_p Incremento de pulso
 ΔE Potencial de paso
Vbp Velocidad de barrido de potenciales
Tret tiempo de retención
Bare Electrodo de trabajo sin modificar