(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 683 026**

(21) Número de solicitud: 201700270

(51) Int. Cl.:

C01B 32/15 (2007.01)
C01B 33/00 (2006.01)
B82Y 30/00 (2011.01)
G01N 27/30 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación:

22.03.2017

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

24.09.2018

Fecha de concesión:

21.06.2019

(45) Fecha de publicación de la concesión:

28.06.2019

(73) Titular/es:

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ (100.0%)
C/ Ancha, 16
11001 Cádiz (Cádiz) ES

(72) Inventor/es:

PALACIOS SANTANDER , José María ;
CABEZA SAUCEDO , Jesús ;
GARCIA ROMERO, Magdalena;
CRESPO ROSA , Joaquín Rafael ;
LÓPEZ IGLESIAS, David;
CUBILLANA AGUILERA , Laura María ;
NARANJO RODRÍGUEZ , Ignacio ;
BELLIDO MILLA , Dolores y
HIDALGO HIDALGO DE CISNEROS, José Luis

(54) Título: **Materiales compuestos sonogel-nanotubos de carbono y sonogel-nanocarbono: procedimiento de fabricación y su aplicación para la construcción de electrodos y (BIO) sensores electroquímicos**

ES 2 683 026 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 683 026**

(21) Número de solicitud: 201700270

(57) Resumen:

Materiales compuestos Sonogel-Nanotubos de Carbono y Sonogel-Nanocarbono: procedimiento de fabricación y su aplicación para la construcción de electrodos y (bio)sensores electroquímicos.

Por primera vez se sintetiza un material compuesto masivo basado en sonogel y nanotubos de carbono o nanocarbono, mediante ultrasonidos de alta energía. Se optimizan los parámetros de síntesis para ambos casos y se aprovechan las propiedades del carbono en forma de nanomaterial para generar materiales que pueden usarse para fabricar (bio)sensores electroquímicos. La presencia de un nanomaterial de carbono incrementa la transferencia electrónica de los dispositivos electródicos y sus parámetros analíticos de calidad.

Otras ventajas del sistema son:

- Rapidez, sencillez y bajo coste del proceso e instrumental utilizado.
- Reducción significativa de la cantidad de carbono para hacer conductor el material.
- La buena renovabilidad mecánica y electroquímica del material permite un uso continuado de estos dispositivos.
- El procedimiento de fabricación es bastante reproducible.

ES 2 683 026 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

DESCRIPCIÓN

Materiales compuestos sonogel-nanotubos de carbono y sonogel-nanocarbono: procedimiento de fabricación y su aplicación para la construcción de electrodos y (bio)sensores electroquímicos.

Sector de la técnica

La presente invención describe, en primer lugar, un método nuevo de fabricación muy sencillo, sin complejidad instrumental y de bajo coste energético de materiales basados en una matriz silícea de sonogel (SNG, redes de silicio y oxigeno obtenidas mediante sonocatálisis, basada en la aplicación de ultrasonidos de alta energía), y carbono en forma de nanotubos de carbono (CNT) o grafito nanopulverizado (nanocarbono, NC). En este tipo de material, la red de sílice posee una estructura tridimensional, que constituye el esqueleto del mismo, a la que se adiciona el carbono en forma de nanomaterial (CNT o NC), que es el componente conductor. Los materiales obtenidos por este procedimiento son: Sonogel-Nanotubos de Carbono (SNG-CNT) y Sonogel-Nanocarbono (SNG-NC).

Se describe también la aplicación del método en la fabricación de (bio)sensores electroquímicos.

Antecedentes de la invención

En la actualidad, existe una importante demanda de dispositivos capaces de llevar a cabo el monitoreo continuo, rápido, selectivo y sensible de compuestos de interés clínico, agroalimentario y/o medioambiental. El progreso de la tecnología está dando lugar a una nueva y completa generación de materiales compuestos e inteligentes que, debido a su interacción con el entorno, suponen el caldo de cultivo perfecto de todo un impresionante arsenal para el desarrollo de nuevos (bio)sensores. Los (bio)sensores amperométricos a base de transductores electroquímicos son herramientas muy prometedoras en este contexto (da Silva, E.T.S.G.; Souto, D.E.P.; Barragan, J.T.C.; Giarola, J. de F.; de Moraes, A.C.M.; Kubota, L.T.; Chemelectrochem, 4 (2017) 1-18; Rotariu, L.; Lagarde, F.; Jaffrezic-Renault, N.; Bala, C.; Trends in Anal, Chem, 79 (2016) 80-87; Yanez-Sedeno, P.; Campuzano, S.; Pingarrón, J.M.; Anal. Chim. Acta 960 (2017) 1-17). Entre las ventajas que los caracterizan cabe destacar la sencillez de la instrumentación requerida para su uso, la fácil preparación de la muestra que implica casi ningún pretratamiento, la rapidez en las mediciones, la versatilidad de la mayoría de los dispositivos (bio)sensores que permite aumentar la selectividad y la sensibilidad, la portabilidad y la posibilidad de miniaturización, entre otros.

En particular, en los últimos anos, el proceso sol-gel ha experimentado un gran desarrollo debido a la posibilidad de generar materiales cerámicos sin necesidad de una etapa de fusión a alta temperatura. Numerosos grupos de investigación han empleado dicho método para la obtención de diversos materiales con aplicabilidad en múltiples áreas, entre ellas el electroanálisis (Rezaei, B.; Khalili Borojeuni, M.; Ensafi, A. Electrochim Acta, 2014, 123, 332-339; Rameshkumar, P.; Viswanathan, P.; Ramaraj, R. Sensor Actuat. B-Chem., 2014, 202, 1070-1077; Rezaei, B.; Lofti-Foroushani, H.; Khalili Borojeuni, M.; Ensafi, A. Mat Sci. Eng. C, 2014, 37, 113-119).

Muchos son los materiales con aplicación electroanalítica que se han ido desarrollando tomando como base esta tecnología, debido a que presentan una baja corriente de fondo y casi constante a lo largo de una amplia ventana de potencial, cinética rápida de un gran número de mediadores electroquímicos comunes, respuesta estable y reproducible, incluso después de una inmersión prolongada del electrodo, y serial alta de corriente de fondo, entre otras

características (Aurobind, S.V.; Amirthalingam, K.P.; Gomathi, H. Adv. Colloid Interface Sci., 121(1-3) (2006) 1-7).

El proceso sol-gel básicamente consiste en la hidrólisis a baja temperatura de un alcóxido monomérico precursor, seguida de una policondensación que conduce a una red porosa de tipo óxido, generalmente inorgánico (Hench, L.L.; West, J.K. Chem. Rev., 90(1) (1990) 33-72; Brinker, C.; Scherer, G. Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing, 1990). Estas redes constituyen matrices adecuadas para la adición de modificantes empleados con fines electroanalíticos.

Entre los primeros en obtener materiales sol-gel (electrodos) para aplicaciones electroquímicas están O. Lev y col. (Tsionsky, M.; Gun, G.; Giezer, V.; Lev, O., Anal Chem.; 66(10) (1994) 1747-1753). Posteriormente, A. R. Guadalupe y col. (Guo, Y.; Guadalupe, A.R. Sensors Actuat. B Chem.; 46 (1998) 213-219; Ji, Z.; Guadalupe, A.R. Electroanalysis, 11(3) (1999) 167-174) prepararon electrodos compuestos grafito/solgel con técnicas de impresión en plantilla y eliminando el disolvente orgánico de la mezcla precursora. Por otra parte, Esquivias y col. (Blanco, E.; Esquivias, L.; Litran, R.; Pinero, M.; Ramirez-del-Solar, M.; de la Rosa-Fox, N.; Appl. Organomet. Chem. 418(13) (1999) 399-418) desarrollaron un proceso de fabricación de materiales sonogel con fines ópticos, basado en la sonocatálisis, consistente en la aplicación de ultrasonidos de alta energía a una mezcla de silano precursor y catalizador ácido, en ausencia también de disolvente orgánico. Finalmente, Cordero-Rando, en cooperación con Blanco y col., consiguieron desarrollar el material Sonogel-Carbono para fines electroquímicos, mediante la adición de un modificante grafítico, necesario para dotar de conductividad eléctrica al material (Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L., Cordero-Rando, M.M., Naranjo-Rodríguez, I., Blanco, E., Esquivias, F.L., Patente ES-2195715-5 B1, Spain, 2001; Cordero-Rando, M.M.; Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L.; Blanco, E.; Naranjo-Rodríguez, I.; Anal. Chem.; 74(10) (2002) 2423-2427; Cordero-Rando, M.M.; Naranjo-Rodríguez, I.; Palacios-Santander, J.M.; Cubillana-Aguilera, L.M.; Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L. Electroanálisis, 17 (2005) 806-814; Cubillana-Aguilera, L.; Palacios-Santander, J.M.; Naranjo-Rodríguez, I.; Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L. J. Sol-Gel Sci. Technol., 40 (2006) 55-64; Izaoumen, N.; Cubillana-Aguilera, L.M.; Naranjo-Rodríguez, I.; Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L.; Bouchta, D.; Temsamani, K.R.; Palacios-Santander, J.M.; Talanta, 78(2) (2009) 370-376).

El Sonogel-Carbono y sus diversas modificaciones han sido satisfactoriamente empleados en la determinación de diversos analitos de interés biológico, agroalimentario y medioambiental (Bellido-Milla, D.; Cubillana-Aguilera, L. M.; El Kaoutit, M.; Hernández-Artiga, M. P.; Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J. L.; Naranjo-Rodríguez, I.; Palacios-Santander, J. M. Anal. Bioanal. Chem., 2013, 405, 3525-3539).

Además, en combinación con la deposición de diversos modificantes nanoparticulados (nanopartículas metálicas o de óxidos metálicos) sobre la superficie del transductor grafítico se mejoran las propiedades electroquímicas del dispositivo constituido, así como los parámetros analíticos de calidad en la determinación de analitos (Ajaero, C.; Abdelrahim, M.Y.; Palacios-Santander, J. M.; Almoraima Gil, M. L.; Naranjo-Rodríguez, I. ; Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J. L.; Cubillana-Aguilera, L. M. Sensor Actuat. BChem., 2012, 171-172, 1244-1256; Abdelrahim, M. Y.; Benjamin, S. R.; Cubillana-Aguilera, L. M.; Naranjo-Rodríguez, I.; Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J. L.; Delgado, J. J.; Palacios-Santander, J. M. Sensors, 2013, 13, 4979-5007).

Cabe destacar que en todos los materiales sonogel citados anteriormente el modificante con base de carbono empleado es el polvo de grafito con un tamaño de partícula micrométrico. Sin embargo, el empleo de nanomateriales con base en carbono, con mejores propiedades mecánicas, químicas, catalíticas y eléctricas, entre otras, como podrían ser los nanotubos de carbono (CNT), o el Nanocarbono (NC) o carbono nanoparticulado, los cuales, además, presentan algunas de sus dimensiones dentro de la escala nanométrica, los hacen muy buenos

candidatos para la síntesis del material sonogel (Punbusayakul, N.; Procedia Engineering 32 (2012) 683-689; Centi, 35 G.; Perathoner, S.; Su, D.S.; Catal. Surv. Asia, 18 (2014) 149-163; Celebanska, A.; Filipiak, M S.; Lesniewski, A.; Jubete, E.; Opallo, M.; Electrochim. Acta, 176 (2015) 249-254).

No obstante, hasta la fecha, los nanomateriales de carbono se han empleado en electroanálisis, fundamentalmente, en forma de películas depositadas (Kim, J.H.; Nam, 5 K.W.; Ma, SB.; Kim, K.B.; Carbon, 44 (2006) 1963-1968), formando materiales compuestos con polímeros (Wang, J.; Musameh, M.; Anal. Chem., 75 (2003) 2075- 2079), como constituyente de pastas (Valentini, F.; Orlanducci, S.; Terranova, M.L.; Amine, A.; Palleschi, G.; Sens. Actuat. B Chem, 100 (2004) 117-125) o crecidos in situ sobre la superficie de los electrodos, de manera individual (Wang, J.; Musameh, M.; Anal. Chim. Acta, 539 (2005) 209-213) o en agrupaciones (Li, J.; Ng, H.T.; Cassell, A.; Fan, W.; Chen, H.; Ye, Q.; Koehne, J.; Han, J.; Meyyappan, M.; Nano Lett., 3 (2003) 597-602). Hasta la fecha se desconoce la existencia de materiales de electrodo que empleen de forma masiva los nanotubos de carbono o el nanocarbono como componente que aporta conductividad al sistema.

Es por ello que se presentan dos nuevos materiales de electrodo basados en sonogel y un nanomaterial de carbono: el primero contiene nanotubos de carbono, y el segundo, nanocarbono o carbono nanoparticulado, como elementos conductores de aquellos. La idea principal de estos dos nuevos materiales es la de emplearlos para la construcción de dispositivos (bio)sensores electroquímicos que aprovechen las peculiares propiedades mecánicas, químicas, catalíticas y eléctricas, entre otras del carbono en forma de nanomaterial, con la finalidad de incrementar y mejorar significativamente la transferencia electrónica y, por tanto, los parámetros analíticos de calidad de los dispositivos construidos con ellos: sensibilidad, limite de detección y cuantificación, reproducibilidad, repetibilidad, estabilidad, etc. Ambos materiales, Sonogel-Nanotubos de Carbono (SNG-CNT) y Sonogel-Nanocarbono (SNG-NC) podrían ser los primeros de estas características recogidos en la bibliografía.
Estos materiales poseen también la ventaja de presentar buenas propiedades estructurales y mecánicas, con poca contracción de volumen y una superficie poco erosionada tras la realización de numerosas medidas electroquímicas, en comparación con el material sonogel con base en polvo de grafito microparticulado. Además, su estabilidad, unida a la fácil y rápida renovabilidad mecánica y/o electroquímica de su superficie, permite su uso continuado durante mayor tiempo, en contraposición a los sensores basados en películas depositadas. Más aún, la cantidad de material grafitico necesaria para que el dispositivo sea conductor queda reducida considerablemente respecto a otros materiales electródicos similares.

Explicación de la invención

Esta patente se solicitar para reconocer un procedimiento nuevo para la obtención de materiales constituidos por una matriz tridimensional de silicio y oxígeno que incluyen en su seno grafito en la forma de nanotubos de carbono o grafito nanopulverizado (nanocarbono). Dicho procedimiento se basa en la química sol-gel, que emplea la sonocatálisis, consistente en la aplicación de ultrasonidos de alta energía sobre una mezcla precursora alcóxido-agua. En la fase inicial se obtiene un sol, utilizando como catalizador una disolución de ácido clorhídrico. Posteriormente, se añade grafito en la forma de nanotubos de carbono, que pueden ser de pared multiple (MWCNT), de diferente pureza o de pared múltiple carboxilados (MWCNT-COOH), o en la forma de grafito nanopulverizado (nanocarbono, NC), obteniendo, tras el proceso de gelificación y secado, diversos compuestos sonogel: Sonogel-Nanotubos de Carbono (SNG-CNT) y Sonogel-Nanocarbono (SNG-NC).

El empleo de nanomateriales (CNTs y NC) resuelve los problemas asociados con una contracción de volumen y una porosidad excesivas del material electroquímico que actuaba como su predecesor: el material Sonogel-Carbono. También se aumenta la adherencia al

soporte y la resistencia a la capilaridad (entrada de liquido en material), minimizándose las fracturas del material tras el secado. De igual modo, dadas las excelentes propiedades mecánicas y eléctricas de los nanotubos de carbono o del grafito nanopulverizado, combinadas con su elevada relación superficie/volumen, se requiere una cantidad de grafito mucho menor para hacer conductor el material: del orden de 15 veces menos empleando CNTs y de la mitad cuando se usa NC.

Gracias a la presencia del nanomaterial (nanotubos de carbono o nanocarbono), se mejora, además, la transferencia electrónica y la sensibilidad de los electrodos frente al material Sonogel-Carbono. Este aumento en la conductividad repercute de forma positiva y directa en parámetros analíticos de calidad, como la sensibilidad y el límite de detección, determinantes en la constitución de (bio)sensores electroquímicos en electroanálisis.

Por otro lado, el método de síntesis empleado, que hace uso de ultrasonidos de alta energía, destaca por un bajo tiempo de reacción, 10 segundos en ambos casos, y una gran sencillez experimental, tan solo se requiere una sonda de ultrasonidos de alta energía. Además, la potencia empleada en la síntesis, unos 8 W (~135 J/mL), indica un bajo coste energético.

A continuación se describen cada uno de los dos materiales que forman parte de la presente invención: el Sonogel-Nanotubos de Carbono (SNG-CNT) y el Sonogel-Nanocarbono (SNG-NC).

Material Sonogel-Nanotubos de Carbono (SNG-CNT)

Para establecer los parámetros de síntesis más adecuados se realizaron una serie de experimentos que se describen más abajo. El estudio del comportamiento del sistema se llevo a cabo mediante el cálculo de una variable de respuesta: la corriente capacitiva en sus dos modalidades, la capacidad observada y la capacidad de la doble capa. Ambas fueron determinadas por medio de la técnica electroanalítica denominada voltamperometría cíclica (CV).

La corriente capacitiva se corresponde con la corriente no faradaica, es decir, la cantidad de carga que no se utiliza para oxidar o reducir una especie electroactiva. La capacidad observada se define como $C_{obs} = j/v$, donde j es la densidad de corriente promedio anódica y catódica y v es la velocidad de barrido (100 mV/s); por otro lado, la capacidad de doble capa (C_{df}) se corresponde con la pendiente de la línea de regresión obtenida al representar los valores medios (absolutos) de las densidades de corriente anódica y catódica, medidas a diferentes velocidades de barrido (intervalo de 10 a 200 mV/s), frente a los valores de la velocidad de barrido.

La primera tarea consiste en obtener un material que presente buenas propiedades estructurales. Para ello se utilizan inicialmente como precursores 500 µL de metiltrimetoxisilano (MTMOS) y 100 µL de HCl que son las cantidades que según la bibliografía ofrecen mejores resultados (M.M. Cordero-Rando, J.L. Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, E. Blanco, I. Naranjo-Rodríguez, Analytical Chemistry 74(10) (2002) 2423-2427). Por tanto, para optimizar la cantidad de MWCNT a emplear en la matriz silícea, se preparan varios materiales Sonogel-MWCNT con diferentes cantidades: 5, 10, 25, 50, 75 y 100 mg de MWCNT. Como resultado de estas primeras experiencias se concluye que no se pueden rellenar capilares con materiales sintetizados empleando cantidades de MWCNT inferiores a 25 mg debido, fundamentalmente, a su baja viscosidad que impide una buena compactación del material en el capilar. Con cantidades mayores a 50 mg se pueden rellenar capilares de electrodo, pero como la contracción que se produce en la etapa de secado es grande, el material Sonogel-MWCNT resultante tampoco compacta bien. A la vista de los resultados la cantidad óptima de MWCNT estará comprendida entre 25 y 50 mg. Además, los capilares se han de colocar para su secado

en un ángulo de 45° respecto a la vertical, manteniendo el hilo de cobre con su aislante plástico insertado en el mismo. De este modo se favorece la compactación y el secado del material, pudiendo someterse luego al pulido mecánico y obtener as! los electrodos.

A continuación, se sumergen electrodos con diferentes cantidades de MWCNT (en el intervalo 25-50 mg) en disolución de Britton-Robinson a pH 4 durante varios días. Cada 3 ó 4 días se registran voltamperogramas en CV para ver si se produce un efecto de absorción y estudiar también el tiempo de vida del electrodo sumergido. Estableciendo una comparación con electrodos fabricados con polvo de grafito (tornado como referencia) en vez de MWCNTs, a los 3 días se observa en aquellos un decaimiento importante de la serial, la cual aparece con mucho ruido a partir del día 10. Para los electrodos constituidos por MWCNTs, el comportamiento de la serial varía en función de la cantidad de MWCNT empleada. En los electrodos con cantidades de MWCNT de 25, 35, 37,5 y 40 g, se observa que, a partir del día 3, los voltamperogramas muestran mucho ruido y, a partir del día 14, la presencia de líquido en el interior del capilar ya es perceptible. Sin embargo, los voltamperogramas cíclicos del electrodo con 32,5 g de MWCNT son muy similares entre si durante un periodo de 17 días, lo que implica una mayor resistencia mecánica y tiempo de vida del electrodo con este material (ver Figura 1).

Por lo tanto, se selecciono 32,5 mg como la cantidad optima de MWCNT a la hora de fabricar los materiales.

Por otra parte, se realizaron diversas experiencias variando la concentración de la disolución de catalizador de 0,2 M a 0,6 M. Un aumento de la concentración de ácido implica que se debe reducir el volumen de catalizador a añadir, lo que se traduce en emplear un volumen de 35 µL de disolución de HCl 0,6 M, en vez de los 100 µL de HCl 0,2 M iniciales. El resultado de aumentar la concentración del catalizador durante el proceso de síntesis se traduce en una mayor estabilidad de las señales electroanalíticas registradas en CV, con menor separación entre las ondas catódica y anódica de las mismas; dicho de otra forma, se reducen los valores de corriente capacitiva (ver Figura 2), que es la tendencia que se busca en la variable de respuesta.

Tras disponer de materiales con un buen grado de compactación y susceptibles de ser utilizados para fabricar los electrodos, los dispositivos obtenidos fueron evaluados mediante el cálculo de las corrientes capacitivas, considerándose como optima aquella formulación empleada para la fabricación de electrodos que ofrecía valores más bajos de las capacidades. La idea principal es la de obtener un material de electrodo lo más adecuado posible para su utilización en dispositivos electroquímicos, y por tanto, con valores menores para la corriente capacitiva.

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos para los valores de capacidad observada y de la doble capa en distintos medios reguladores del pH: tampón universal Britton-Robinson pH 4, tampón acético/acetato pH 4,4, tampón fosfato (PBS) pH 6.9, y tampón amonio/amoniaco pH 9. Los datos se corresponden con un material SNG-CNT de formulación no optimizada; es decir, utilizando 25 mg de MWCNT y 100 µL de HCl 0,2 M.

Electrodo	Disolución reguladora	C_{obs} (μF/cm^2) a 100 mV/s	C_{DC} (μF/cm^2)
Sonogel con grafito (500 mg)	PBS pH 7	28,08	24,47
	BR pH 4	37,51	36,34
SNG-CNT	AcH/AcNa pH 4,4	99,28	108,98
SNG-CNT	BR pH 4	47,15	45,75
SNG-CNT	PBS pH 7	69,8	57,39
SNG-CNT	NH_3/NH_4^+ pH 9	145,01	123,6

Tabla 1: Valores de capacidad observada y capacidad de la doble capa calculados en diferentes medios reguladores del pH para el material SNG-CNT y tomando como referencia un material sonogel a base de polvo de grafito (500 mg).

Como se desprende de la tabla anterior, en general, los valores de capacidad observada son ligeramente más elevados que los de la doble capa, como se recoge en la bibliografía (Ajaero, C.; Abdelrahim, M.Y.; Palacios-Santander, J.M.; Almoraima Gil, M L.; Naranjo-Rodríguez, I.; Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L.; Cubillana-Aguilera, L.M. Sensors Actuat. B-Chem., 2012, 171-172, 1244-1256; Abdelrahim, M.Y.; Benjamin, S.R.; Cubillana-Aguilera, L.M.; Naranjo-Rodríguez, I.; Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L.; Delgado, J.J.; Palacios-Santander, J.M. Sensors, 2013, 13, 4979-5007). Las capacidades de los electrodos son distintas ya que dependen del medio, puesto que, en función de la fuerza iónica del mismo y del valor de pH, el electrodo necesitara una cantidad de corriente distinta para cargarse. También cabe destacar que los valores C_{obs} son mayores para el material SNG-CNT que para el material sonogel a base de grafito, aunque en medio Britton-Robinson y a pH 4 son muy similares. Por otra parte, para el material SNG-CNT, las capacidades presentan valores más bajos cuando se emplea reguladora Britton-Robinson o pH próximo a la neutralidad y los valores más altos cuando se emplea reguladora de NH3/NH4+ y acético/acetato (valores de pH alejados de la neutralidad).

Sin embargo, cuando se calculan los valores de ambos parámetros para un electrodo fabricado con el material SNG-CNT optimizado: 32,5 mg de MWCNT y 35 μL de disolución de HCl 0,6 M, los resultados son notablemente mejores y diferentes a los anteriores (ver Tabla 2), lo que indica que las variaciones incluidas en el procedimiento de fabricación (cantidad de MWCNT, volumen y concentración de catalizador, modo de secado, etc.) han servido para mejorar significativamente el comportamiento electroquímico de los electrodos fabricados con dicho material. En la Tabla 2 se representan los valores promedio (n=3) de capacidad observada y de la doble capa, junto con las desviaciones estándar y los respectivos coeficientes de variación, para varios electrodos SNG-CNT optimizados cuyos voltamperogramas se han registrado en CV y reguladora Britton-Robinson a diferentes valores de pH en el intervalo 1,25-10.

BR a pH	C_{obs} (μF/cm^2) a 125 mV/s	CV C_{obs} (%)	C_{DC} (μF/cm^2)	CV C_{DC} (%)
1,25	6,53 ± 0,26	4,01	5,79 ± 0,32	5,54
4	7,03 ± 0,72	7,97	5,32 ± 0,42	7,97
7	4,32 ± 0,27	6,22	3,66 ± 0,67	18,38
10	5,01 ± 0,30	6,08	4,02 ± 0,59	14,62

Tabla 2: Valores de promedio de capacidad observada y capacidad de la doble capa junto con las desviaciones estándar y los respectivos coeficientes de variación (%), calculados para varios electrodos SNG-CNT optimizados en un medio Britton-Robinson a diferentes valores de pH.

Como puede verse, los valores de capacidad son ahora mucho más bajos para el material optimizado con respecto al material no optimizado y el material sonogel a base de grafito, dando unos coeficientes de variación bastante aceptables, en general.
Por otra parte, si cambiamos el medio regulador, la tendencia de mejora se mantiene, obteniéndose capacidades similares a valores de pH parecidos (ver Tabla 3), exceptuando el medio NH_3/NH_4^+ a pH 9, donde son ligeramente más elevados.

Reguladora y pH	C_{obs} (μF/cm^2) a 125 mV/s	CV C_{obs} (%)	C_{DC} (μF/cm^2)	CV C_{DC} (%)
PBS pH 6,9	5,55 ± 0,38	6,88	4,20 ± 0,13	3,03
Acético/acetato pH 4,4	6,95 ± 0,37	5,40	5,54 ± 0,42	7,66
NH_3/NH_4^+ pH 9	8,99 ± 0,15	1,65	7,75 ± 0,22	2,83

Tabla 3: Valores de promedio de capacidad observada y capacidad de la doble capa junto con las desviaciones estándar y los respectivos coeficientes de variación (%), calculados para varios electrodos SNG-CNT optimizados en diferentes medios reguladores de pH.

En general, cuanto menor sea el valor de la capacidad, mejor será el rendimiento electroquímico de los electrodos, ya que se produce una menor acumulación de carga en el electrodo y, por tanto, existe una mayor disponibilidad de dicha de carga para la oxidación/reducción del analito a determinar. Por tanto, puede considerarse que el material SNG-CNT optimizado puede ser muy útil para el análisis de sustancias de interés medioambiental, biológico y/o agroalimentario. Además, al obtenerse valores de capacidad un orden de magnitud inferior a los del material sonogel basado en grafito, se espera mejorar los resultados de los análisis en cuanto a parámetros analíticos de calidad se refiere.

Los estudios empleando la voltamperometría cíclica en presencia de hexacianoferrato (II) de potasio ($K_4Fe(CN)_6$) y de cloruro de hexaaminrutenio (III) ($[Ru(NH_3)_6]Cl_3$), especies redox típicamente reversibles, permitieron evaluar el comportamiento electroquímico del sensor desarrollado con el material SNG-CNT optimizado. Se realizaron medidas, con tres electrodos en cada caso, a diferentes velocidades de barrido (10-200 mV/s), en presencia de cada una de las especies anteriores con una concentración de 1 mM y en medio regulador de fosfato 0,2 M (pH 6.9).

En el caso del $K_4Fe(CN)_6$, los voltamperogramas presentan un par de picos bien definidos y están atribuidos a la oxidación y reducción del hierro (Fe) presente en el analito. El pico anódico se asocia a la oxidación del Fe(II) a Fe(III) mientras que el pico catódico corresponde a la reducción del Fe (III) a Fe(II), tal y como muestra la siguiente reacción:

$$Fe(CN)_6^{4-} \rightleftharpoons Fe(CN)_6^{3-} + 1\,e^-$$

En todos los casos, se obtuvo una diferencia entre los potenciales de pico anódico y catódico (AEP) que aumenta ligeramente con la velocidad de barrido, siendo el AEP a velocidades bajas de 110 mV y AEP a velocidades altas de 180 mV. Como se desprende de estos datos, los valores son superiores a 0.059/n voltios, donde n es el numero de electrones implicados en el proceso redox (1 en nuestro caso), y dependientes de la velocidad de barrido,

lo que es característico de los sistemas cuasi-reversibles. Hay que destacar también que la relación entre las intensidades de pico anódica y catódica, I_a e I_c, respectivamente, es constante en los tres electrodos siendo $I_a/I_c \approx 1$, hecho que está en consonancia con la reversibilidad o cuasireversibilidad del proceso (F Scholtz (Ed.), *Electronalytical Methods. Guide to experiments and Application*, 2nd Ed.; Springer Verlag: Hildelberg, 2010).

En los tres electrodos también se observa que al aumentar la velocidad de barrido, la altura del pico también aumenta. Además, la intensidad de corriente es proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, presentando un coeficiente de correlación de 0.99 en el pico anódico y de 0.98 en el pico catódico en todos los casos. Debido a estos resultados se puede decir que la cinética del proceso electroquímico está controlada preferentemente por el fenómeno de difusión (F. Scholtz (Ed.), *Electronalytical Methods. Guide to experiments and Application*, 2nd Ed.; Springer Verlag: Hildelberg, 2010).

Cuando se emplea como analito de prueba el $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$, los voltamperogramas de los tres electrodos presentan un par de picos bien definidos atribuibles a la oxidación y reducción del rutenio (Ru) presente en el analito. El pico anódico se asocia a la oxidación del Ru(III) a Ru(IV) mientras que el pico catódico corresponde a la reducción del Ru(IV) a Ru(III). El proceso redox se puede resumir mediante la siguiente ecuación:

$$Ru(NH_3)_6^{3+} \rightleftharpoons Ru(NH_3)_6^{4+} + 1\,e^-$$

La posición de los picos anódico ($E_{a,p}$) y catódico ($E_{c,p}$) son constantes a medida que aumenta la velocidad de barrido, siendo la posición del pico anódico -139 mV y la posición del pico catódico -210 mV. Esto es típico de sistemas reversibles. Además, en los tres electrodos se observa que al aumentar la velocidad de barrido, aumenta la altura del pico. También se observa que la intensidad de corriente es proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido teniendo un coeficiente de correlación promedio de 0.99. Debido a estos resultados se puede decir que la cinética del proceso electroquímico está controlada por el fenómeno de la difusión.

En cuanto a su aplicación como sensor en electroanálisis, cabe destacar que los picos asociados a la oxidación de ácido ascórbico, analito de prueba, son relativamente estrechos y están bien definidos. En la Figura 3 se muestran los voltamperogramas registrados empleando la voltamperometría diferencial de impulsos (DPV), para la determinación de ácido ascórbico en el intervalo de concentraciones comprendido entre $1{,}14 \times 10^{-6}$ M y $3{,}31 \times 10^{-3}$ M (3 órdenes de magnitud). Para cada curva de calibrado se utilizaron 18 puntos a diferente concentración de ácido ascórbico dentro del rango medido, con tres replicas. Las medidas se realizaron en reguladora PBS a pH 6.9.

Tras calcular los principales los parámetros analíticos de calidad para el ácido ascórbico se observa que son comparables a otros sensores recogidos en la bibliografía (Tabla 4), todos ellos modificados: nanotubos de carbono y PEDOT, sonogel con base en grafito (Sonogel-Carbono) sin modificar, Sonogel-Carbono modificado con sononanopartículas de oro, Sonogel-Carbono modificado con nanopartículas de óxido de cerio y Sonogel-Carbono modificado con nanopartículas de óxido de cerio que, a su vez, están decoradas con sononanoparticulas de oro y otros dispositivos electroquímicos modificados con MWCNTs (Lin, K.C.; Tsai, T.H.; Chen, S.M. *Biosens*. *Bioelectron*., 2010, 26, 608-614; Ajaero, C.; Abdelrahim, M.Y.; Palacios-Santander, J.M.; Almoraima Gil, M L.; Naranjo-Rodríguez, L; Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L.; Cubillana-Aguilera, L.M. Sensors Actuat. *B-Chem*., 2012, 171-172, 1244-1256; Abdelrahim, M.Y.; Benjamin, S.R.; Cubillana-Aguilera, L.M.; Naranjo-Rodríguez, L; Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L.; Delgado, J.J.; Palacios-Santander, J.M. Sensors, 2013, 13, 4979-5007; Cao, F.;

Zhang, L.; Tian, Y.; J. *Electroanal. Chem*.15 781 (2016) 278-283; Inoue, Y.; Okazaki, Y.; Muguruma, H.; Inoue, H.; Ohsawa, T.; *Anal. Sci. 32* (2016) 797-799; Deng, K.; Li, X.; Huang, H.; *Microchim. Acta*, 183 (2016) 2139-2145; Tsierkezos, N.G.; Othman, S.H.; Ritter, U.; Hafermann, L.; Knauer, A.; Kohler, J.M.; Downing, C.; McCarthy, E.K.; *Sensors Actuat*. B-Chem., 231 (2016) 218- 229; Yan, S.; Li, X.; Xiong, Y.; Wang, M.; Yang, L.; Liu, X.; Li, X.; Alshahrani, L. Abdullah M.; Liu, P.; Zhang, C.; *Microchim*. Acta, 183 (2016) 1401-1408; da Silva, L.V.; Silva, F.A.S.; Kubota, L.T.; Lopes, C.B.; Lima, P.R.; Costa, E.O.; Pinho Junior, W.; Goulart, M.O.F.; J. *Solid State Electrochem*., 20 (2016) 2389-2393), entre otros.

Material	Sensibilidad (μA/mM cm^2)	Límite de detección (μM)	Rango lineal (μM)	R^2
MWCNT-PEDOT	2,20	100	100-2000	0,9950
SNG-C	222	11,3	1,5-4000	0,9999
SNG-C-AuSNPs	809	3,71	1,5-4000	0,9998
SNG-C-CeO_2	93,3	4,14	1,5-4000	0,9983
SNG-C-AuSNPs/CeO_2	117	2,93	1,5-4000	0,9995
SNG-CNT	**39,04**	**3,84**	**1,14-3310**	**0,9990**
Fibra de CNT dopada con N	1100	20	50-1000	-----
CNT/Au	32,55	-----	30-2000	0,999
CNT-NiNorcorrol/GCE	0,20	2,0	7,5-2000	-----
CNT dopado con N y decorado con NPs de Rh, Pd, Ir, Pt y Au	-----	0,9-8,7 según las NPs utilizadas	99-600	-----
Ni-bis(1,10-fenantrolina)-SWCNT/GCE	13,48	12	30-1547	0,9987
Ácido vainilico-MWCNT/GCE	0,89	3,5	5-120	0,998

Tabla 4. Comparativa de parámetros de calidad de distintos materiales para la determinación de AA. Medidas realizadas empleando voltamperometría diferencial de impulsos (DPV) como técnica electroanalítica y un pH próximo a 7.

Los límites de detección y cuantificación, parámetros analíticos de calidad empleados para la caracterización electroquímica del sensor, se calcularon como tres y diez veces la desviación estándar del blanco dividida por la pendiente de la curva de calibrado, respectivamente (Miller, J. N.; Miller, J. C. Estadística y Quimiometría para Química Analítica, 4 Ed., Prentice Hall, Madrid, 2002).

Como puede verse, la sensibilidad del electrodo SNG-CNT frente a ácido ascórbico es bastante buena, comparable y, en algunos casos, mejor que otros dispositivos electroquímicos más complejos que incluyen más modificantes. Además, la ventaja principal de los electrodos fabricados con SNG-CNT es que se su superficie se puede renovar, como ya se ha comentado anteriormente, mecánica y/o electroquímicamente, dando lugar a un nuevo electrodo que mantiene su comportamiento electroquímico. A ello sumamos la buena sensibilidad debida a la

presencia del nanomaterial, fundamentalmente, que facilita la transferencia de carga debido a sus peculiares propiedades fisicoquímicas.

Por otro lado, hay que destacar también que las modificaciones realizadas en la mayoría de los materiales mostrados en la tabla anterior potencian la sensibilidad y la transferencia de carga. Sin embargo, el material SNG-CNT desarrollado no está modificado aun, constituye un material base, sin ningún añadido, por lo que es de esperar que posteriores modificaciones del mismo, con otras especies o nanomateriales, por ejemplo, generen resultados aun mejores a los ya obtenidos.

También se llevaron a cabo estudios de repetibilidad y reproducibilidad. En el caso de la repetibilidad, se registraron tres curvas de calibrado para cada electrodo, y para la reproducibilidad se utilizaron tres electrodos diferentes. Tanto en los estudios de repetibilidad como de reproducibilidad, se obtuvieron valores de desviación estándar relativa (RSD) inferior al 5% en todos los casos. La buena reproducibilidad es indicativa de que el procedimiento de fabricación genera sensores con comportamientos electroquímicos similares entre sí.

Los electrodos fabricados con el material SNG-CNT fueron caracterizados también mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS), permitiendo corroborar los resultados de repetibilidad anteriores, en base al grado de erosión superficial de los dispositivos.

Tal y como puede verse en la Figura 4, la contracción del material una vez secado en el capilar (Figura 4C), así como la erosión sufrida por el uso electroquímico continuado del electrodo SNG-CNT (Figura 4D) son apenas apreciables, si las comparamos con el material sonogel a base de polvo de grafito (Figuras 4A y 4B, respectivamente), lo que indica que el comportamiento electroquímico del electrodo con el nuevo material SNGCNT es mucho mejor, en términos de estabilidad y repetibilidad de las medidas. La Figura 4D recoge el espectro EDS para el material SNG-CNT, revelando la presencia de C, Si, y O, como era de esperar.

Así mismo, se llevo a cabo la validación del sensor mediante la determinación de ácido ascórbico en una muestra comercial de zumo de manzana para bebes, obteniendo también resultados muy satisfactorios. Para ello se empleo el método de adiciones estándar (Tabla 5). La técnica electroanalítica que se utilizo para la determinación del ácido ascórbico fue la DPV.

Electrodo	Medida (mg/l)* ± DE#	Recuperación (%) ± DE	RSD (%)
Electrodo 1	21,23 ± 1,43	97,37 ± 5,41	6,72
Electrodo 2	24,79 ± 1,16	113,72 ± 5,34	4,70

*Tabla 5: Resultados experimentales para el contenido de AA en zumo de manzana para bebés empleando el método de adiciones estándar. Se emplearon dos electrodos y 6 determinaciones por electrodo Medio electrolítico: PBS 0,2 M pH 6,9. *Valor de referencia (HPLC): 21.8 mg/l; concentración en etiqueta = 25 mg/l como valor medio. #DE. Desviación estándar.*

Como conclusión final podría decirse que los electrodos SNG-CNT optimizados con 32.5 mg de MWCNT y 35 µL de disolución de HCl 0,6 M pueden ser empleados para determinar analitos en muestras reales, como es el caso del ejemplo que se ha incluido aquí.

Material Sonogel-Nanocarbono (SNG-NC)

Al igual que se hizo con el material SNG-CNT, el estudio del comportamiento del sistema se llevo a cabo mediante el cálculo de la corriente capacitiva en sus dos modalidades, la capacidad observada y la capacidad de la doble capa, como variable de respuesta, determinadas también ambas a partir de voltamperometría cíclica.

Con este nuevo material, el parámetro fundamental a optimizar fue la cantidad de grafito nanopulverizado o nanocarbono (NC) a utilizar con idea de obtener un material con unas propiedades mecánicas y estructurales adecuadas que permitiesen la construcción de electrodos o dispositivos sensores electroquímicos. Para ello se utilizan como precursores 500 µL de metiltrimetoxisilano (MTMOS) y 100 µL de HCl que son las cantidades que según la bibliografía ofrecen mejores resultados (M.M. Cordero-Rando, J.L. Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, E. Blanco, I. Naranjo-Rodríguez, Analytical Chemistry 74(10) (2002) 2423-2427).

En la Tabla 6 se recogen las cantidades probadas de NC, así como una descripción de los resultados obtenidos en cada caso.

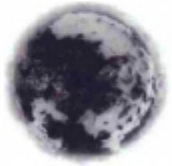
CANTIDAD DE NANOCARBONO	OBSERVACIONES	IMÁGENES
250 mg	El material no solidificó y no se pudieron construir electrodos.	-
300 mg	El material no gelificó inmediatamente, pero compactó poco tiempo después. Se obtuvieron algunos electrodos con muchas dificultades.	
325 mg	El material gelificó y compactó con el tiempo. Se obtuvieron electrodos con facilidad, aunque hubo que esperar unos minutos para lograr una buena compactación.	
350 mg	El material gelificó pasado un tiempo. Se obtuvieron electrodos sin dificultad con el material bien compactado.	
375 mg	El material gelificó y compactó con el tiempo. Se obtuvieron electrodos, pero conforme pasaba el tiempo el material solidificaba en gránulos incompresibles.	
400 mg	El material se aglomeraba rápidamente. Era difícil de compactar y de utilizarlo para construir electrodos.	

Tabla 6: Resultados de los ensayos de preparación del material Sonogel-Nanocarbono empleando distintas cantidades de NC en el intervalo de 300 a 400 mg.

De las seis configuraciones de NC probadas y descritas anteriormente para la elaboración de electrodos, se descarto la de 250 mg debido a la imposibilidad de construir los electrodos. Por consiguiente, los estudios recogidos más adelante se refieren exclusivamente a los electrodos que contienen en su composición las cantidades de 300, 325, 350, 375 y 400 mg de NC. Es necesario comentar, además, que los capilares con el material se disponen para su secado en un ángulo de 45° respecto a la vertical; posteriormente, y una vez secos, se someten al proceso de pulido mecánico para obtener los electrodos.

A continuación, los dispositivos obtenidos fueron evaluados mediante el cálculo de las corrientes capacitivas, considerándose como optima aquella formulación empleada para la fabricación de electrodos que ofrecía valores más bajos de las capacidades. De nuevo, la idea principal consiste en disponer de un material de electrodo con los menores valores de la variable de respuesta, lo que, en principio, los haría más adecuados para su uso en dispositivos (bio)sensores electroquímicos.

En la Figura 5 se muestran los voltamperogramas cíclicos correspondientes a electrodos construidos con el material SNG-NC empleando diferentes cantidades de NC (300 - 400 mg), en diferentes medios reguladores del pH: Britton-Robinson pH 4 (Figura 5A) y tampón de fosfato (PBS) pH 6,9 (Figura 5B), empleando una velocidad de barrido de 100 mV/s. Como se desprende de la figura, el material SNG-NC fabricado con 350 mg de NC presenta una distancia entre curvas anódica y catódica mucho menor que el resto, indicativo de una menor acumulación de carga en el electrodo y, por tanto, de valores más pequeños para la corriente capacitiva. Por tanto y desde el punto de vista de la capacidad, los dispositivos con esta configuración, deberían presentar, en general, un mejor comportamiento electroquímico.

En la Tabla 7, se muestran los valores de C_{obs}, obtenidos a 100 mV/s, y de C_{DC} para las distintas configuraciones de Sonogel-Nanocarbono, en dos medios reguladores diferentes: Britton-Robinson pH 4 y PBS pH 6,9.

Cantidad de NC empleada	C_{obs} (μF/cm^2) a 100 mV/s		C_{DC} (μF/cm^2)	
	BR pH=4	PBS pH=6,9	BR pH=4	PBS pH=6,9
300 mg	285,98	274,30	158,84	170,86
325 mg	103,86	116,31	96,48	112,96
350 mg	26,17	27,11	23,45	26,02
375 mg	236,42	221,60	186,57	85,08
400 mg	342,78	808,25	202,53	399,71

Tabla 7: Valores de capacidad observada y capacidad de la doble capa calculados en diferentes medios reguladores del pH para electrodos fabricados con el material SNG-NC, con diferentes cantidades de NC.

Como puede verse en la tabla, materiales SNG-NC con cantidades superiores e inferiores a 350 mg generan electrodos con valores de C_{obs} y C_{DC} más elevados, con lo que se corroboran los resultados obtenidos en los voltamperogramas de CV que se muestran en la Figura 5. Los valores de capacidad para el material con 350 mg de NC son muy parecidos a los del electrodo Sonogel-Carbono (sonogel con 500 mg de grafito pulverizado tornado como referencia: C_{obs} = 28,08 y CDC = 24,47 pF/cm^2, ver Tabla 1) (Ajaero, C.; Abdelrahim, M.Y.; Palacios-Santander, J.M.; Almoraima Gil, M.L.; Naranjo-Rodríguez, I.; Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L.; Cubillana-Aguilera, L.M. Sensors Actuat. B-Chem., 2012, 171-172, 1244-1256; Abdelrahim, M.Y.; Benjamin, S.R.; Cubillana-Aguilera, L.M.; Naranjo-Rodríguez, I.; Hidalgo-Hidalgo de Cisneros,

J.L.; Delgado, J.J.; Palacios-Santander, J.M. Sensors, 2013, 13, 4979-5007). Como las capacidades dependen del medio (fuerza iónica y pH), en este caso, los valores son más bajos cuando se emplea reguladora Britton-Robinson, a valores de pH más ácido.

Como se ha comentado anteriormente, en general se considera que cuanto menor sea el valor de la capacidad, mejor será el rendimiento electroquímico de los electrodos, ya que se produce una menor acumulación de carga en el electrodo y, por tanto, existe una mayor disponibilidad de dicha de carga para la oxidación/reducción del analito a determinar. Por tanto, el material SNG-NC podría considerarse de gran utilidad para el análisis de sustancias de interés medioambiental, biológico y/o agroalimentario.

Los estudios empleando la voltamperometría cíclica en presencia de hexacianoferrato (II) de potasio ($K_4Fe(CN)_6$) permitieron evaluar el comportamiento electroquímico del sensor desarrollado con el material SNG-NC. Se realizaron medidas, con tres electrodos en cada caso (probando distintas cantidades de NC en el intervalo 300-400 mg de NC), a diferentes velocidades de barrido (10, 25, 50, 75, 100, 125, 150 y 200 mV/s), en presencia de $K_4Fe(CN)_6$ con 10 mM de concentración y en medio Britton-Robinson pH 4.

En todos los casos estudiados, los voltamperogramas presentan un par de picos bien definidos: un pico anódico asociado a la oxidación del Fe(II) a Fe(III), y un pico catódico atribuido a la reduction del Fe (III)a Fe(II), correspondientes a la reacción:

$Fe(CN)_6^{4-} \leftrightarrow Fe(CN)_6^{3-} + 1\ e^-$ Por otra parte, la diferencia entre los potenciales de pico anódico y catódico (AEP) es siempre superior a 0.059/n, característico de los sistemas cuasireversibles (F. Scholtz (Ed.), Electronalytical Methods. Guide to experiments and Application, 2nd Ed.; Springer Verlag: Hildelberg, 2010). Además, la relación entre las intensidades de pico anódica y catódica es: $I_a/I_c \approx 1$, también en consonancia con lo anterior.

Por otra parte, también se observa que al aumentar la velocidad de barrido, la altura del pico se incrementa, siendo la intensidad de corriente proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (coeficientes de correlación de 0.99 para serial anódica y catódica, en la mayoría de los casos), con lo que la cinética del proceso electroquímico está controlada preferentemente por difusión (F. Scholtz (Ed.), Electronalytical Methods. Guide to experiments and Application, 2nd Ed.; Springer Verlag: Hildelberg, 2010).

En cuanto a su aplicación como sensor en electroanálisis, se eligió el ácido ascórbico como analito de prueba, empleando electrodos con configuraciones del material SNGNC sintetizado con 325, 350 y 375 mg de NC. En todos los casos, y a pesar de las diferencias existentes en los valores de capacidad según la cantidad de NC utilizada, los picos asociados a la oxidación de ácido ascórbico son relativamente estrechos y están bien definidos.

En la Figura 6 y a modo de ejemplo, se muestran los voltamperogramas registrados empleando la voltamperometna diferencial de impulsos (DPV), para la determinación de ácido ascórbico en el intervalo de concentraciones comprendido entre $1{,}00 \times 10^{-5}$ M y $3{,}20 \times 10^{-3}$ M; concretamente: 10, 50, 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 2850, 3200 mM. El material de electrodo empleado fue SNG-NC con 375 mg de NC. Para cada curva de calibrado se utilizaron puntos a diferente concentración de ácido ascórbico dentro del rango medido, con tres replicas. El medio electrolítico estaba constituido por el tampón PBS a pH 6.9.

Tras calcular los principales parámetros analíticos de calidad para el ácido ascórbico: sensibilidad = 62,65 $\mu A/mMcm^2$ (entendida como la pendiente de la curva de calibrado); limite de detección = 12,7 μM; R^2 = 0,999; y rango dinámico lineal = 10 -3200 μM se observa que son comparables a los de otros sensores recogidos en la bibliografía (ver Tabla 4) y en algunos casos incluso mejores que los de otros dispositivos electroquímicos más complejos que

incluyen mas modificantes. Al igual que los electrodos con el material SNG-CNT, la superficie de los electrodos basados en sonogel y nanocarbono son fáciles de renovar mecánica y/o electroquímicamente, dando lugar a un nuevo electrodo que mantiene su comportamiento electroquímico. A ello sumamos la buena sensibilidad debida a la presencia del nanomaterial, fundamentalmente, que facilita la transferencia de carga debido a sus peculiares propiedades fisicoquímicas.

También hay que destacar que el material SNG-NC desarrollado no está modificado, constituye un material base, sin ningún añadido, por lo que es de esperar que posteriores modificaciones del mismo, con otras especies o nanomateriales, por ejemplo, generen resultados aun mejores a los ya obtenidos.

También se hicieron estudios de repetibilidad y reproducibilidad. En el caso de la repetibilidad, se obtuvieron 3 curvas de calibrado con el mismo electrodo y para la reproducibilidad se realizo una curva de calibrado con 3 electrodos diferentes basados en la misma cantidad de NC. En cuanto a los resultados correspondientes al primer parámetro, para todas las configuraciones (325, 350 y 375 mg de NC) la desviación estándar relativa (RSD) referida a la sensibilidad (pendiente de la curva de calibrado) es inferior al 1%, indicativo de una excelente repetibilidad. Por otra parte, en relación a la reproducibilidad, el material SNG-NC con 375 mg es el que ofrece mejores valores de RSD (%):5,93%. Para los otros dos casos, los porcentajes fueron un poco más elevados, aunque aceptables.

Para finalizar la caracterización electroquímica de los materiales SNG-NC, se demuestra la viabilidad de estos para la fabricación de biosensores electroquímicos amperométricos, mediante la inmovilización enzimática en su superficie de la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP, horseradish peroxidase), que emplea H_20_2 como mediador electroquímico. Los dispositivos biosensores electroquímicos se caracterizan, generalmente, por una muy alta especificidad, su bajo coste, ofrecen una respuesta muy rápida, poseen una sensibilidad excelente, presentan un tamaño relativamente compacto y son fáciles de implementar en dispositivos electródicos para la detección de biomoléculas (Bahadir, E.B.; Sezginturk, M.K., Anal. Biochem., 478(1) (2015) 107-120).

La composición de los biosensores probados es la siguiente:

- Transductor electroquímico: material SNG-NC con diferentes cantidades de NC (325, 350 y 375 mg).
- Mezcla enzimática (Attar, A.; Cubillana-Aguilera, L.; Naranjo-Rodríguez, I.; Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L.; Palacios-Santander, J.M.; Amine, A.; Bioelectrochem., 101 (2015) 84-91).
    - Enzima: peroxidasa de rabano picante (HRP) disuelta en agua Milli-Q con o sin nanoparticulas de oro (AuNPs) en funcion del biosensor deseado: 2 UA/biosensor (unidades enzimaticas por biosensor).
    - Albumina de suero bovino (BSA) al 0,5% en agua Milli-Q.
    - Glutaraldehido (GA) al 0,5% en agua Milli-Q.

Por tanto, se emplean varios tipos de biosensores en función de la cantidad de NC del transductor (325, 350 y 375 mg); el biosensor con AuNPs en la mezcla enzimática se probó con el transductor SNG-NC (350 mg), lo que implica un total de 4 biosensores diferentes. Las AuNPs fueron sintetizadas según la bibliografía (Cubillana-Aguilera, L.M.; Franco-Romano, M.; Gil, M.L.A.; Naranjo-Rodríguez, I.; Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L.; Palacios-Santander, J.M.; Ultrason. Sonochem., 18 (2011) 789-794) y presentan las siguientes características: 5.14 ± 1.65 nm de tamaño promedio, con el 90% de las partículas se encuentran entre 3 y 8 nm de diámetro.

Tras realizar la deposición enzimática sobre los electrodos de Sonogel-Nanocarbono, se realizaron los ensayos del dispositivo biosensor mediante la técnica electroanalítica de cronoamperometría frente a 3 analitos diferentes: ácido cafeico (ACF), catecol (CAT) e hidroquinona (HDQ), con la finalidad de calcular sus parámetros analíticos de calidad y comparar estos biosensores con los que aparecen en la bibliografía y que están formados por un material sonogel con 500 mg de polvo de grafito (Attar, A.; Cubillana-Aguilera, L.; Naranjo-Rodríguez, I.; Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L.; Palacios-Santander, J.M.; Amine, A.; Bioelectrochem., 101 (2015) 84-91). Los intervalos de concentración estudiados para los analitos fueron: 1 - 60 µM para ACF y HDQ y 10 - 600 µM para CAT.

En la Figura 8 se presentan, como ejemplo, las señales cronoamperométricas correspondientes a la determinación del ácido cafeico para los biosensores construidos con el material SNG-NC con diferentes cantidades de NC y, como referencia, el biosensor basado en el material sonogel con 500 mg de polvo de grafito, sin AuNPs. Como puede observarse, la serial correspondiente a los biosensores HRP/SNG-NC con diferentes cantidades de NC son similares y con unos saltos de densidad de corriente mucho mas grandes (sobre todo para el biosensor con 350 mg de NC) que los correspondientes al biosensor basado en polvo de grafito. Esto indica que la sensibilidad del dispositivo electroquímico se ve incrementada por la presencia de carbono nanopulverizado en el material sonogel, debido, fundamentalmente, a la mejora de la transferencia de corriente realizada por el nanomaterial.

En la Tabla 8, se recogen los mejores parámetros de calidad para dichos biosensores considerando los tres analitos:

Biosensor	Ácido cafeico		Hidroquinona		Catecol	
	Sensibilidad ($A \cdot M^{-1} \cdot cm^{-2}$)	LOD (nM)	Sensibilidad ($A \cdot M^{-1} \cdot cm^{-2}$)	LOD (nM)	Sensibilidad ($A \cdot M^{-1} \cdot cm^{-2}$)	LOD (nM)
HRP/SNG 500 mg C[1]	1,4	72	1,34	100	3,17	800
HRP/SNG-NC 325 mg	59,14	0,54	128,37	1,74	1391,61	23,84
HRP/SNG-NC 350 mg	21,29	0,72	222,6	0,96	3647,56	17,83
HRP/SNG-NC 375 mg	28,28	1,84	318,19	0,92	882,22	11,24

Tabla 8: Parámetros analíticos de calidad para los tres analitos (ácido cafeico, hidroquinona y catecol): sensibilidad (pendiente de la curva de calibrado) y límite de detección para los biosensores de HRP, utilizando el material SNG-NC como transductor con distintas cantidades de NC, y tomando como referencia el material sonogel con 500 mg de polvo de grafito. El medio electrolítico es acético/acetato de sodio a pH 5 y con H_20_2 a la concentración de 10 mM; potencial aplicado = -0,15 V. 1 Attar, A; Cubillana-Aguilera, L; Naranjo-Rodríguez, I.; Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L.; Palacios-Santander, J.M.; Amine, A; Bioelectrochem., 101 (2015) 84-91.

Como se desprende de la tabla, para todos los materiales SNG-NC, los valores de sensibilidad son superiores con diferencia a los del biosensor basado en el material sonogel y grafito pulverizado. Además, los límites de detección son inferiores en algún orden de magnitud. Esto demuestra que la presencia de nanocarbono en el material de electrodo facilita e incrementa la transferencia electrónica, gracias a sus peculiares propiedades como nanomaterial, frente al polvo de grafito.

En la Tabla 9, se recogen los parámetros cinéticos y analíticos de calidad para el biosensor (HRP+AuNPs)/SNG-NC 350 mg y se comparan con los descritos en la bibliografía para un biosensor con AuNPs basado en sonogel y 500 mg de polvo de grafito. Claramente, en todos los casos, se observa que los valores de sensibilidad y límite de detección son mejores para el biosensor basado en el nuevo material SNGNC.

Por otra parte, en cuanto a los parámetros cinéticos, J_{max} representa la densidad de corriente máxima, que debe ser lo más alta posible, como ocurre para el material SNG-NC con 375 mg de NC. En cuanto al parámetro K_M, definido como concentración mínima de sustrato (analito) a la que la velocidad de biocatálisis del enzima es igual a la mitad de la densidad de corriente máxima, cuanto mayor sea este valor, mejor será el proceso de catálisis llevado a cabo por el enzima, hecho que es bastante evidente cuando se utiliza el material SNG-NC.

Analito	Electrodos	J_{max} ($\mu A \cdot cm^{-2}$)	K_M (μM)	Sensibilidad ($A \cdot M^{-1} \cdot cm^{-2}$)	LOD (nM)
Ácido cafeico	(HRP+AuSNPs)/SNG 500 mg C[1]	30	2,5	3,5	36
	(HRP+AuSNPs)/SNG-NC 350 mg	24,47	20,83	328,17	0,77
Hidroquinona		20,35	21,65	293,97	1,38
Catecol		130,06	179,53	182,02	8,66

Tabla 9: Parámetros cinéticos: J_{max} y K_M, y analíticos de calidad para los tres analitos (ácido cafeico, hidroquinona y catecol): sensibilidad y limite de detección para los biosensores de HRP con AuNPs, utilizando el material SNG-NC como transductor con distintas cantidades de NC, y tomando como referencia el material sonogel con 500 mg de polvo de grafito. El medio electrolítico es acético/acetato de sodio a pH 5 y contiene 10 mM de H_20_2; potencial aplicado = -0,15 V. [1] Attar, A; Cubillana-Aguilera, L; Naranjo-Rodrlguez, I.; Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L; Palacios-Santander, J.M.; Amine, A.; Bioelectrochem., 101 (2015) 84-91.

Estos resultados sirven para reafirmar que la presencia del Nanocarbono, como nanomaterial modificante masivo del transductor de electrodo, incrementa la transferencia electrónica y aumenta en gran medida la sensibilidad. Por consiguiente, se concluye que el material SNG-NC es viable para su uso como biosensor electroquímico, mejorando los parámetros cinéticos y de calidad respecto al material sonogel basado en 500 mg de polvo de grafito.

Por otra parte, en cuanto se refiere a la caracterización estructural de los electrodos fabricados con el material SNG-NC, la superficie de los materiales con 350 y 375 mg fue caracterizada mediante microscopia de fuerza atómica (AFM) en modo tapping. El tamaño de la zona de muestreo fue de 1,5x1,5 ó de 2,5x2,5 pm. De acuerdo con los datos obtenidos a partir del AFM, en ambos casos, la rugosidad de la superficie se encuentra dentro de la escala manométrica (<100 nm): 31,43 nm para electrodos con 350 mg de NC y entre 11,6 y 14,0 nm para el electrodo con 375 mg (ver perfiles en Figura 7). Además, en la mayoría de los casos, predominan los valles en la superficie del material, indicativo de la presencia de poros. En la misma línea, también de los datos se desprende la presencia de picos bastante agudos que

podrían atribuirse al proceso de pulido de los materiales. A partir de los perfiles obtenidos, se corrobora que la superficie obtenida del Sonogel-Nanocarbon presenta rugosidad a escala nanométrica, ofreciendo así una mayor superficie especifica que una superficie lisa.

Por otra parte, también se empleo la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para caracterizar el material, obteniéndose las siguientes bandas:

- 3450 cm^{-1}: agua, vibración del grupo -OH.
- 2885 cm^{-1}: vibración simétrica de CH_3.
- 2360 cm^{-1}: estiramiento asimétrico $C0_2$.
- 1575 cm^{-1}: estiramiento asimétrico de los grupos carboxilatos (COO-).
- 1273 cm^{-1}: Si-CH_3, vibración de deformación CH_3 simétrica.
- 1125 - 1026 cm^{-1}: Si-O-Si, tensión Si-O.
- 771 cm^{-1}: Si-CH3, tensión Si-C.

Las bandas a 1273, 1125 - 1026 y 771 cm 1 se corresponden con las recogidas en la literatura para un material sonogel a base de polvo de grafito (500 mg) (Cubillana-Aguilera, L.M.; Palacios-Santander, J.M.; Naranjo-Rodríguez, I.; Hidalgo-Hidalgo-de- Cisneros, J.L.; J Sol-Gel Sci Techn. 40 (2006) 55-64). Además, aparecen 3 bandas más a 2885, 2360 y 1575 cm^{-1} que son perfectamente acordes con la presencia de nanocarbono en el material.

Finalmente, la superficie de los electrodos basados en el material SNG-NC a distintas concentraciones de NC se caracterizo mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS) (ver Figura 9). Tal y como se observa en dicha figura, la contracción del material tras el secado de los electrodos es un poco más acusada para los materiales SNG-NC con 325 y 375 mg de NC (ver Figuras 9A, 9B y 9C). De igual modo, la erosión sufrida por el uso electroquímico continuado del electrodo SNG-CNT (Figuras 9B, 9D y 9F), en la parte central del mismo, es similar en todos los casos; aunque para los materiales SNG-NC con 325 y 375 mg de NC también parece ser un poco más apreciable en la zona próxima al capilar. Por consiguiente y a la vista de las micrografías, el material SNGNC con 350 mg parece ser el que menor contracción, durante el secado, y erosión, por su uso, sufre. Finalmente, el análisis EDS revela la presencia de C, Si y O, como era de esperar en un material de estas características.

En conclusión, las novedades que presentan los nuevos materiales desarrollados, SNG-CNT y SNG-NC, empleados para la construcción de (bio)sensores electroquímicos se pueden resumir del siguiente modo:

- El proceso de síntesis se lleva a cabo en poco tiempo y con un bajo coste energético, empleando un sistema instrumental sencillo. Tan solo es necesaria una sonda de ultrasonidos de alta energía.

- Con este material se pueden fabricar fácilmente dispositivos (bio)sensores electroquímicos con una superficie fácilmente renovable mecánica y electroquímicamente, lo que implica una gran ventaja frente a los electrodos basados en recubrimientos, que son los empleados usualmente en la bibliografía. Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, estos electrodos constituyen los primeros electrodos masivos y monolíticos de nanotubos de carbono o nanocarbono fabricados hasta la fecha, puesto que generalmente se emplean en forma de películas depositadas o se generan in situ.

- Se reduce en gran medida la cantidad de carbono a emplear como modificante masivo conductor de los dispositivos electroquímicos: hasta 15 veces menos para el SNG-CNT y entre 1,3 y 1,5 veces menos para el SNG-NC.

- Buenas propiedades mecánicas y estructurales de los materiales: muy poca contracción de volumen y erosión superficial prácticamente inapreciable tras múltiples medidas electroquímicas en dispositivos (bio)sensores.

- Buen comportamiento electroquímico: baja capacidad observada y de la doble capa, comparable a la de otros materiales de electrodo o incluso menores hasta en un orden de magnitud.

- Como materiales base que son y sin modificaciones, frente a un analito de prueba como el ácido ascórbico, los parámetros de calidad de los (bio)sensores obtenidos con dichos materiales son bastante buenos, comparables o incluso mejores a los de otros sensores modificados de forma más o menos compleja según la bibliografía. Además, permite su uso en muestras reales. En el caso de su uso como biosensores, los parámetros cinéticos también son mejorados respecto a la literatura.

- Finalmente, cabe resaltar que, gracias a las peculiares propiedades de los nanomateriales (CNT y NC) presentes de forma masiva en los dispositivos electródicos, se incrementa, en gran medida, la transferencia electrónica durante el proceso de medida electroquímico. Esto conlleva un aumento también de la sensibilidad y, por tanto, la mejora en los parámetros cinéticos y analíticos de calidad de los (bio)sensores.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Voltamperogramas cíclicos correspondientes a un electrodo fabricado con el material Sonogel-Nanotubos de Carbono con 32,5 mg de MWCNT y 100 µL de HCl 0,2M como catalizador y sumergido durante varios días (0, 3, 7, 10, 14 y 17 días) en una disolución reguladora Britton-Robinson pH 4. La velocidad de barrido es de 50 mV/s.

Figura 2. Voltamperogramas cíclicos correspondientes a dos electrodos Sonogel-Nanotubos de Carbono sintetizados con 32,5 mg de MWCNT y diferente volumen y concentración de la disolución de catalizador ácido: (rojo) 35 µL de disolución de HCl 0,6 M y (azul) 100 µL de HCl 0,2 M. El medio electrolítico se corresponde con una reguladora Britton-Robinson pH 4 y la velocidad de barrido es de 50 mV/s.

Figura 3. Voltamperogramas obtenidos a partir de DPV correspondientes al sensor electroquímico basado en el material Sonogel-Nanotubos de Carbono optimizado (32,5mg de MWCNT y 35 µL de disolución de HCl 0,6 M, en las condiciones adecuadas de secado), empleando como medio electrolítico PBS 0,2 M (pH=6,9), en presencia de diferentes concentraciones de ácido ascórbico: (a) línea base; (b) 1,14 µM (≈$1{,}14 \times 10^{-6}$ M); (c) 3,43 µM; (d) 8,00 µM; (e) 12,56 µM; (f) 23,94 µM; (g) 35,27 µM; (h) 46,55 µM; (i) 80,13 µM; (j) 0,1133 mM; (k) 0,1785 mM; (l) 0,2839 mM; (m) 0,3854 mM; (n) 0,5063 mM; (o) 0,7020 mM; (p) 0,8907 mM; (q) 1,272 mM; (r) 1,996 mM; (s) 3,307 mM (=3,31x1 O'3 M). Los voltamperogramas fueron registrados bajo las siguientes condiciones experimentales: 0,4 s de tiempo de intervalo, 100 mV de amplitud de modulación y 16 mV de potencial de paso. El gráfico interior representa la intensidad de corriente frente a la concentración de analito correspondiente con la curva de calibrado obtenida a partir de los voltamperogramas anteriores. También se representa la curva de ajuste y el coeficiente de determinación R^2.

Figura 4. Micrografías SEM registradas para electrodos basados en materiales Sonogel-Nanotubos de Carbono optimizado (32,5 mg de MWCNT y 35 µL de disolución de HCl 0,6 M, en las condiciones adecuadas de secado) y Sonogel-Carbono (sonogel basado en polvo de grafito: 500 mg). Las Figuras 4A y 4B corresponden al electrodo sin usar y usado (más de 150 medidas en diversos medios electrolíticos de distinto pH) del Sonogel-Carbono y las Figuras 4C y 4D corresponden al electrodo sin usar y usado del Sonogel-Nanotubos de Carbono (en las

mismas condiciones que antes). Todas las micrografías fueron obtenidas empleando un microscopio electrónico de barrido Quanta 200 acoplado a un sistema EDAX. En el caso del Sonogel-Carbono (Figuras 4A y 4B), el potencial de aceleración fue de 30 kV. En el caso del Sonogel-Nanotubos de Carbono (Figuras 4C y 4D), el potencial de aceleración fue de 20 kV. La Figura 4E representa el espectro EDS realizado sobre la superficie del electrodo Sonogel-Nanotubos de Carbono optimizado a una magnificación de x5000 y con un spot de 7. El porcentaje en peso de cada uno de los elementos es el siguiente: C 62,63%; O 31,51%; Si 5,85%.

Figura 5. Voltamperogramas cíclicos correspondientes a electrodos construidos con el material SNG-NC empleando diferentes cantidades de NC (300, 325, 350, 375 y 400 mg), en diferentes medios reguladores del pH: A) Britton-Robinson pH 4, y B) tampón de fosfato (PBS) pH 6,9. La velocidad de barrido es de 100 mV/s.

Figura 6. Voltamperogramas obtenidos a partir de DPV correspondientes al sensor electroquímico basado en el material Sonogel-Nanocarbono (375 mg de NC), empleando como medio electrolítico PBS 0,2 M (pH=6,9), en presencia de diferentes concentraciones de ácido ascórbico: 0,01 (=1,00*10'5 M); 0,05; 0,10; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00; 2,50; 2,82; y 3,20 mM (=3,20*103 M). Los voltamperogramas fueron registrados bajo las siguientes condiciones experimentales: 0,4 s de tiempo de intervalo, 100 mV de amplitud de modulación y 16 mV de potencial de paso. El grafico interior representa la intensidad de corriente frente a la concentración de analito correspondiente con la curva de calibrado obtenida a partir de los voltamperogramas anteriores. También se representa la curva de ajuste y el coeficiente de determinación R^2.

Figura 7. A) Imágenes en 2D, B) 3D y C) perfiles de la superficie de un electrodo de Sonogel-Nanocarbono (375 mg de NC) para un mismo tamaño de muestreo. Las imágenes fueron adquiridas en modo tapping.

Figura 8. Cronoamperogramas correspondientes a la determinación del ácido cafeico para diferentes biosensores HRP/SNG-NC con diferentes cantidades de NC y, como referencia, el biosensor basado en el material sonogel con 500 mg de polvo de grafito. El medio electrolítico es acético/acetato de sodio a pH 5 y contiene 10 mM de H20 2; el potencial aplicado es de -0,15 V. El volumen de la celda electroquímica es de 10 mL y el medio se somete a agitación ligera y constante. Las concentraciones de analito fueron: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 pM.

Figura 9. Imágenes de SEM para electrodos construidos con los materiales SNG-NC de: A) 325 mg de NC y sin usar, B) 325 mg de NC y usado, C) 350 mg de NC y sin usar, D) 350 mg de NC y usado, E) 375 mg de NC y sin usar, y F) 375 mg de NC y usado. Los electrodos usados fueron utilizados al menos en 50 medidas. Todas las micrografías fueron obtenidas empleando un microscopio electrónico de barrido 10 Quanta 200 acoplado a un sistema EDAX, a un potencial de aceleración de 20 kV.

Modo de realización de la invención

En este apartado se detalla el método de fabricación de los materiales SNG-CNT y SNG-NC, así como las condiciones experimentales establecidas para la realización de los estudios electroquímicos.

a) Preparación de la mezcla precursora: Colocar en un pesafiltro de 16 mL los siguientes volúmenes de silano y disolución catalizadora acida (a partir de HCl al 32%, Merck):
Silano: 500 µL de MTMOS (pureza p.s., Merck).

Catalizador: 35 µL de disolución de HCl 0,6 M (para SNG-CNT) ó 100 µL de disolución de HCl 0,2 M (para SNG-NC).

b) Revestir el pesafiltro con una camisa de agua con el fin de evitar el sobrecalentamiento. Sumergir la punta de la sonda en la mezcla precursora y aplicar ultrasonidos de alta energía durante 10 s, estableciendo un valor de potencia inferior a la potencia máxima de salida (600 W): 8 W. La insonación se llevo a cabo empleando un generador de ultrasonidos MISONIX 4000 equipado con punta de titanio reemplazable de 13 mm de diámetro.

Transcurrido el tiempo de insonación, adicionar la cantidad correspondiente de nanotubos de carbono al sonosol: 32,5-300 mg de MWCNT de diferente pureza (MWCNT 6-9 nm x 5 µm, C > 95%, Sigma-Aldrich; 25-35% MWCNT basis 2-15 nm x 1-10 µm, Sigma-Aldrich; >7,5% MWCNT basis 7-15 nm x 0,5-10 µp, Sigma-Aldrich; o también MWCNT-COOH funcionalizados al 5% con grupos carboxilicos, C > 95%, 10 nm x 1,5 µp, Dropsens) y 325-375 mg de grafito nanopulverizado o nanocarbono (NC, >99%, Sigma-Aldrich).

c) Una vez adicionada la cantidad correspondiente, homogeneizar con ayuda de una espátula durante aproximadamente 1 minuto, generando un sólido con cierta viscosidad. Para la fabricación de los sensores electroquímicos con los materiales anteriores, insertar el capilar de vidrio (diámetro externo de 1,55±0,05 mm y diámetro interno de 1,15±0,05 mm) en el seno del solido una vez llevada a cabo la homogeneización, rotando en torno a su eje vertical en ambos sentidos con el fin de favorecer el ascenso de la mezcla por capilaridad. Evitar la formación de huecos en el electrodo durante el relleno.

d) Compactar la mezcla introduciendo un cable con su aislamiento de plástico en el capilar con el relleno, apoyando previamente dicho capilar en un vidrio de reloj. Una vez realizada la compactación, retirar el vidrio de reloj y presionar el material con el fin de dejar una porción del relleno fuera del capilar. Procurar que la altura del material en su interior sea 5 mm, aproximadamente.

e) Disponer los capilares a 45° sobre un soporte durante unas 24-48 horas.

f) Una vez transcurrido el tiempo de secado, pulir el exceso de material con una lija de carburo de silicio P1200 de Struers (tamaño de grano de 10,6 µp) y, posteriormente, con un papel blanco satinado (colocado sobre una superficie plana y no rugosa) hasta la obtención de una superficie lisa y brillante.

g) Los sensores electroquímicos fabricados de esta manera son empleados como electrodos de trabajo en una celda de tres electrodos que emplea un electrodo auxiliar de platino (o carbono vitrificado) y un electrodo de referencia de Ag/AgCl, 3 M KCl (podría emplearse también uno de calomelanos o cualquier otro electrodo que sirva como referencia). La conexión del electrodo de trabajo al equipo de medida se realiza a través de un cable de cobre, en contacto con el material de relleno.

Para la caracterización electroquímica de los dispositivos (bio)sensores basados en los materiales Sonogel-Nanotubos de Carbono y Sonogel-Nanocarbono, se emplearon como electrolito 25 mL de una disolución reguladora Britton-Robinson (BR) pH 4 o una disolución reguladora de fosfato (PBS) pH 6,9, dependiendo del pH al cual se deseaba realizar la determinación. Para el material SNG-CNT se empleo, además, reguladora de ácido acético y acetato de sodio pH 4,4 y reguladora de amoniaco y cloruro amónico pH 9-10. Para el estudio

del material SNG-NC como biosensor, se utilizaron 10 mL de reguladora ácido acético y acetato de sodio pH 5 como electrolito.

- La determinación de capacidades se llevo a cabo empleando la voltamperometría cíclica en ausencia de analito, a diferentes velocidades de barrido: 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 y 200 mV/s. El rango de medida fue de -0.5 V a 1.0 V, empleando diferentes disoluciones reguladoras, a distintos valores de pH.

- El estudio del mecanismo electroquímico frente a ($K_4Fe(CN)_6$) para ambos materiales, y de cloruro de hexaaminrutenio (III) ([Ru(NH3)6]Cl3), sólo para SNGCNT se llevo a cabo en CV, en presencia de 1 mM de la especie química en cuestión. Se realizaron medidas a diferentes velocidades de barrido: 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 y 200 mV/s, siendo el intervalo de potenciales de -0.5 V a 1.0 V Los electrolitos empleados fueron Britton-Robinson (BR) pH 4 o una disolución reguladora de fosfato (PBS) pH 6,9, según el caso.

- Los biosensores SNG-NC basados en enzima peroxidasa y con o sin AuNPs, HRP/SNG-NC y (HRP+AuNPs)/SNG-NC, respectivamente, se construyeron siguiendo el método químico de entrecruzamiento de acuerdo con la bibliografía (Attar, A.; Cubillana-Aguilera, L.; Naranjo-Rodríguez, I.; Hidalgo- Hidalgo de Cisneros, J.L.; Palacios-Santander, J.M.; Amine, A.;
Bioelectrochem., 101 (2015) 84-91):

  - HRP/SNG-NC: se pesa 1 mg de enzima HRP en un eppendorf de fondo redondo y se disuelve en 1 mL de agua Milli-Q. De toman 17 µL de dicha disolución y se traspasa a otro eppendorf. Se adicionan en el nuevo contenedor 3 µL de BSA (0,5 % en agua Milli-Q), 25 µL de agua Milli-Q y 5 µL de glutaraldehido (0,5 % en agua Milli-Q). Dicha mezcla se remueve con ayuda de un agitador vórtex. Para la deposición de la mezcla enzimática se colocan los electrodos verticalmente y, con ayuda de una micropipeta, se depositan 4,1 µL de la mezcla (equivalentes a 2 UA/biosensor) sobre la superficie de los electrodos. Finalmente, se dejan secar de 1 a 2 horas, a temperatura ambiente, y se mantienen sumergidos en una disolución reguladora de AcH/AcNa pH 5, mientras no son utilizados, y conservados en el frigorífico.

  - (HRP+AuNPs)/SNG-NC: se pesa 1 mg de enzima HRP en un eppendorf de fondo redondo y se disuelve en 0,32 mL de agua Milli-Q y 0,68 mL de AuSNPs, preparadas según (Cubillana-Aguilera, L.M.; Franco-Romano, M.; Gil, M.L.A.; Naranjo-Rodríguez, I.; Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L.; Palacios-Santander, J.M.; Ultrason. Sonochem., 18 (2011) 789-794). De esa disolución se toman 17 µL y se traspasan a otro eppendorf, en el que se añaden 3 µL de BSA (0,5 % en agua Milli-Q), 25 µL de la disolución de AuSNPs sintetizadas y 5 µL de glutaraldehido (0,5 % en agua Milli-Q). Dicha mezcla se remueve con ayuda de un agitador vórtex. Una vez preparada la mezcla enzimática de HRP+AuSNPs, se realiza la deposición y conservación de los biosensores del mismo modo comentado anteriormente.

- La determinación de los parámetros analíticos de calidad: sensibilidad, límite de detección, reproducibilidad y repetibilidad se llevo a cabo realizando adiciones de AA de una disolución madre 0,25 M a una celda que contiene 25 mL de disolución reguladora PBS 0,2 M (pH=6,9). Las concentraciones de ácido ascórbico en celda resultantes tras cada adición se indican a continuación: 0,01 (≈$1{,}00\times10^{-5}$ M); 0,05; 0,10; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00; 2,50; 2,85; y 3,20 mM (≈$3{,}20\times10^{-3}$ M) para SNG-CNT, y 1,14 (≈$1{,}14\times10^{-6}$ M); 3,43; 8,00; 12,56; 23,94; 35,27; 46,55; 80,13; 113,3; 178,5; 283,9; 385,4; 506,3; 702,0; 890,7; 1272; 1996; 3307 µM (≈3,31x10-3 M) para el SNG-NC. Para el cálculo de los

parámetros cinéticos de los biosensores HRP/SNG-NC: J_{max} y K_M, el intervalo de concentraciones de los analitos fue: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 μM para ácido cafeico e hidroquinona, y 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 y 600 μM para catecol. En el caso del ácido ascórbico, la técnica electroanalítica empleada fue la voltamperometna diferencial de impulsos, seleccionando las condiciones atendiendo a estudios previos con materiales sonogel con 500 mg de polvo de grafito (Ajaero, C.; Abdelrahim, M.Y.; Palacios-Santander, J. M.; Almoraima Gil, M. L.; Naranjo-Rodrlguez, I.; Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J. L.; Cubillana-Aguilera, L. M. Sensors Actuat. BChem., 2012, 171-172, 1244-1256): potencial de paso de 16 mV, amplitud de modulación de 100 mV y tiempo de intervalo de pulso de 0,4 s.
Tomando las intensidades de pico para cada valor de concentración se obtuvieron las curvas de calibrado, cuyas pendientes corresponden a la sensibilidad. Para el ácido cafeico, la hidroquinona y el catecol, la técnica empleada fue la cronoamperometría, con un potencial fijo de -0,15 V y un tiempo máximo de medida de 3000 s. En este caso se calcularon las diferencias de densidad de corriente entre la serial sin analito y la serial con analito y se representaron frente a la concentración del analito para obtener la curva de calibrado, cuya pendiente se corresponde con la sensibilidad.

- Para la determinación de ácido ascórbico en zumo de manzana para bebes se partió de 24 ml de disolución reguladora de fosfato 0.2 M a pH 6.9 (PBS), a la cual se le adiciono 1 ml de zumo de manzana (concentración aproximada de ácido ascórbico de la etiqueta = 25 mg/l; valor de referencia obtenido por cromatografía liquida de alta resolución (HPLC): 21.8 mg/l). La técnica voltamperométrica empleada fue la DPV y la determinación del analito en la muestra se llevo a cabo mediante el método de adiciones estándar.

Aplicación industrial

El material sintetizado es susceptible de aplicación industrial, ya que puede ser empleado como sensor electroquímico acoplado a cualquier sistema de medida portátil comercial en la determinación in situ de analitos electroactivos de interés en múltiples áreas: agroalimentación, biomedicina y medioambiente. La utilización masiva de nanomateriales, como son los CNTs o el NC, unido a la renovabilidad de la superficie de los electrodos con base en dichos materiales, permite solventar los problemas de contaminación o envenenamiento de las superficies de los dispositivos electroquímicos fabricados con estos materiales. La renovabilidad superficial destaca por su rapidez y facilidad, permitiendo el uso del sensor repetidas veces. Dicha renovación puede ser mecánica, empleando una lija de grano fino P1200, y/o electroquímica, empleando ácido sulfúrico como medio electrolítico, en el rango de concentraciones 0,05 M y 0,1 M, y la voltamperometría cíclica como técnica electroanalítica. Así mismo, su bajo tiempo de respuesta permite la realización de multitud de análisis en un tiempo reducido, lo cual supone una gran ventaja en aplicaciones electroanalíticas.

Por último, la presencia de nanomateriales incrementa la transferencia electrónica a través de los (bio)sensores electroquímicos lo que, a su vez, permite mejorar los parámetros analíticos de calidad de dichos dispositivos: sensibilidad, límite de detección, limite de cuantificación, repetibilidad, reproducibilidad, estabilidad, etc., y aumentar su aplicabilidad para la detección de analitos o especies químicas de interés medioambiental, biomédico y/o agroalimentario, entre otros.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de materiales compuestos sonogel y nanotubos de carbono, basado en la catálisis ácida, y empleando ultrasonidos de alta energía.

2. Un procedimiento para la preparación de materiales compuestos sonogel y nanocarbono, basado en la catálisis acida, y empleando ultrasonidos de alta energía.

3. Un procedimiento para la fabricación de materiales según reivindicaciones 1 y 2, que comprende las siguientes etapas:

• Preparación de la mezcla precursora, que contiene: metiltrimetoxisilano (MTMOS), y una disolución de catalizador ácido.

• Aplicación de ultrasonidos de alta energía a la mezcla precursora durante 10 segundos: obtención del sol.

• Adición al sonosol de un nanomaterial con base en carbono, y homogeneización.

• Rellenado del molde o del capilar (en el caso de (bio)sensores).

• Secado durante un tiempo mínimo de veinticuatro horas y obtención del material sonogel.

4. Un procedimiento para la fabricación de materiales según reivindicaciones 1 a 3, en las que el nanomaterial con base en carbono puede consistir en: nanotubos de carbono de pared múltiple carboxilados o sin carboxilar, nanocarbono o carbono nanoparticulado o cualquier otro nanomaterial con base en grafito.

5. Material compuesto Sonogel-Nanotubos de Carbono (SNG-CNT), obtenido según reivindicaciones 1 a 4, que comprende:

• Silano hidrofóbico precursor: 500 µL del reactivo comercial metiltrimetoxisilano.

• Catalizador ácido: disolución acuosa de HCl 0,6 M, en el intervalo 35-70 µL o 100 µL de disolución acuosa de HCl 0,2 M.

• Nanomaterial con base en carbono: nanotubos de carbono de pared múltiple carboxilados o sin carboxilar, en el intervalo 32,5-300 mg del reactivo comercial.

6. Material compuesto Sonogel-Nanocarbono (SNG-NC), obtenido según las reivindicaciones 1 a 4, que comprende:

- Silano hidrofóbico precursor: 500 µL del reactivo comercial metiltrimetoxisilano.
- Catalizador ácido: 100 µl de disolución acuosa de HCl 0,2 M.
- Nanomaterial con base en carbono: nanocarbono o carbono nanoparticulado, en el intervalo 325-375 mg del reactivo comercial.

7. Uso de los materiales obtenidos según reivindicaciones 1 a 4 y descritos en las reivindicaciones 5 y 6, para la construcción de sensores y biosensores amperométricos modificados.

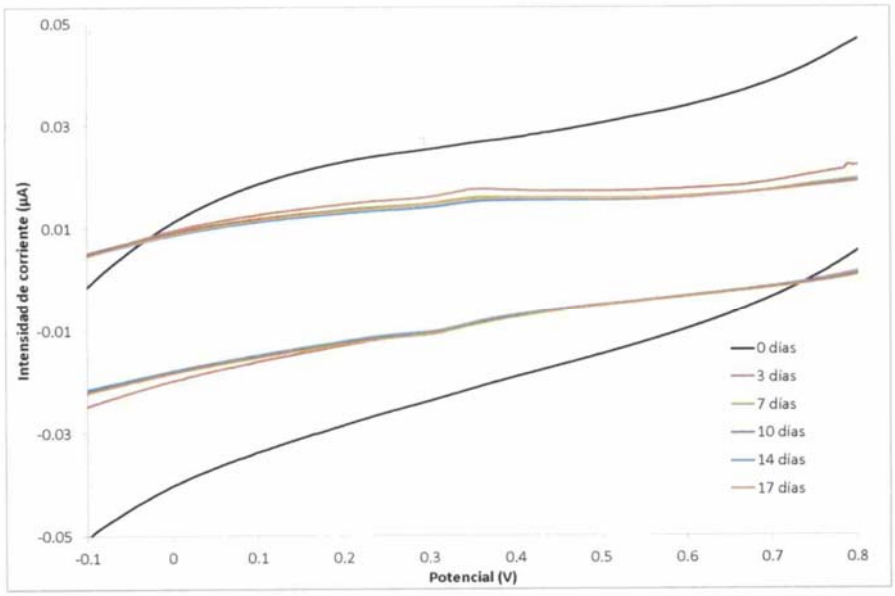

0.05
0.03
0.01
-0.01
-0.03
-0.05
Intensidad de corriente (µA)
-0.1
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
Potencial (V)
0 días
3 días
7 días
10 días
14 días
17 días

Figura 1

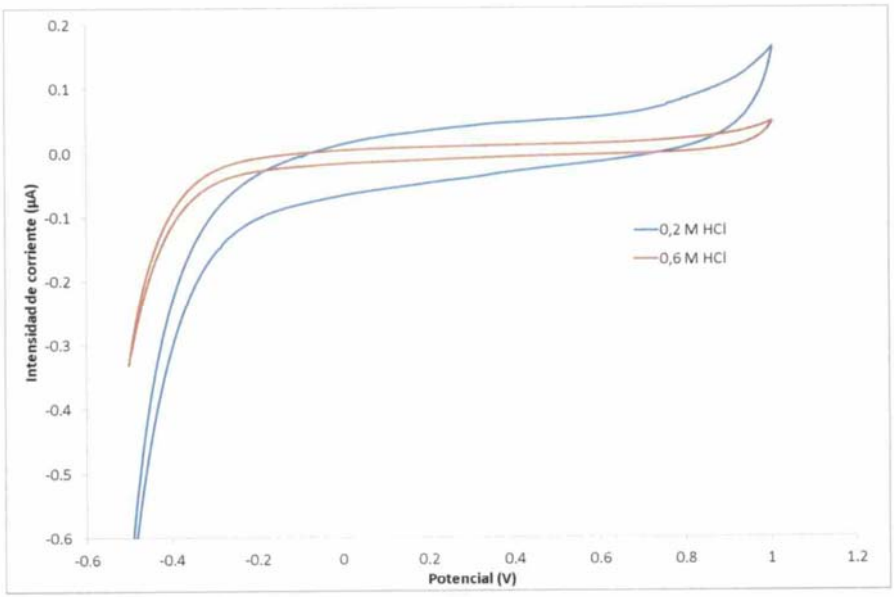

0.2
0.1
0.0
-0.1
-0.2
-0.3
-0.4
-0.5
-0.6
Intensidad de corriente (µA)
-0.6
-0.4
-0.2
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
Potencial (V)
0,2 M HCl
0,6 M HCl

Figura 2

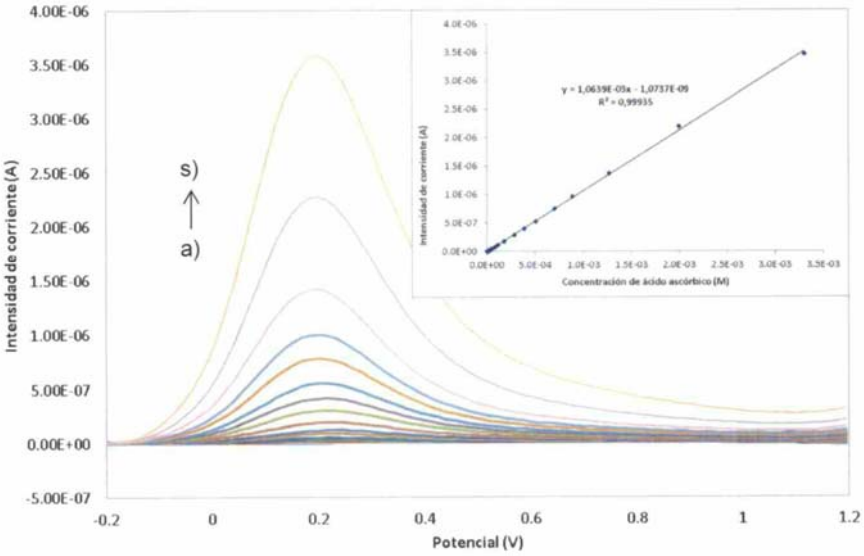

4.00E-06
3.50E-06
3.00E-06
2.50E-06
2.00E-06
1.50E-06
1.00E-06
5.00E-07
0.00E+00
-5.00E-07
Intensidad de corriente (A)
s)
a)
-0.2
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
Potencial (V)
y = 1,0639E-03x - 1,0737E-09
R² = 0,99935
Intensidad de corriente (A)
Concentración de ácido ascórbico (M)

Figura 3

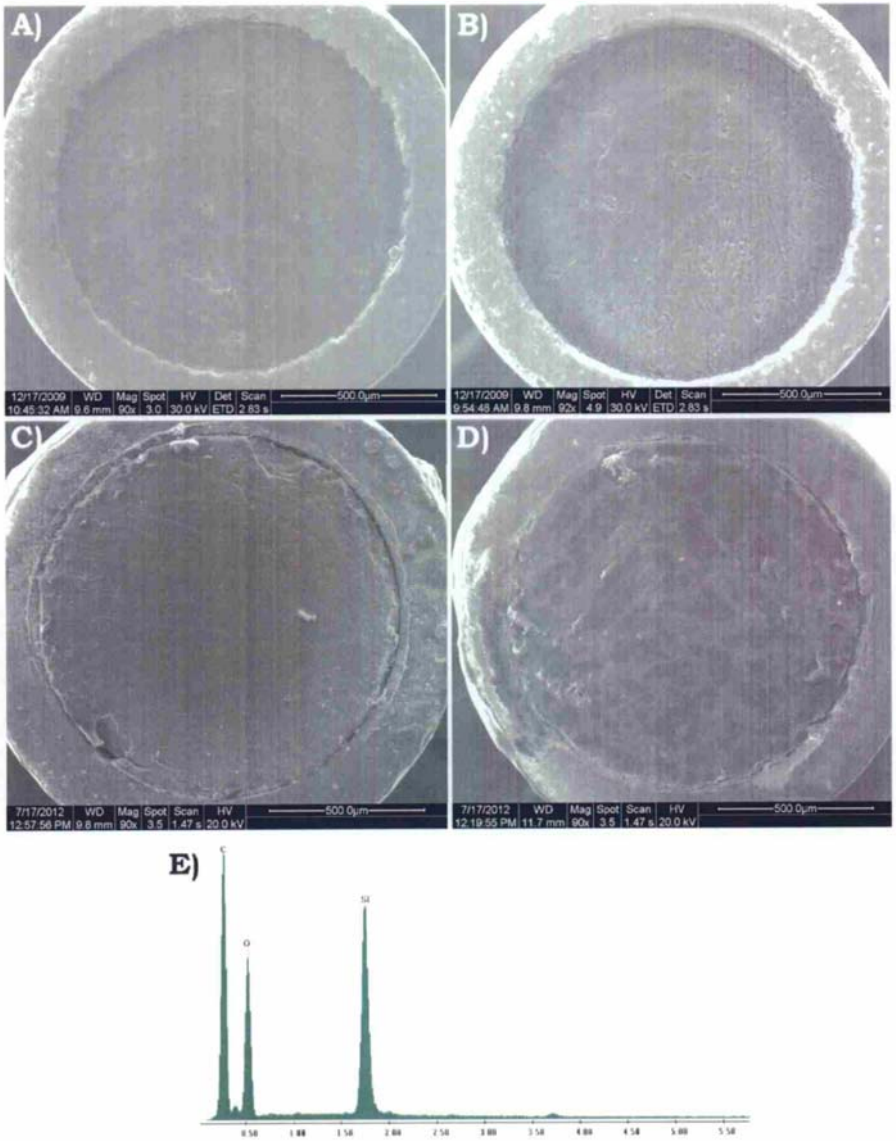
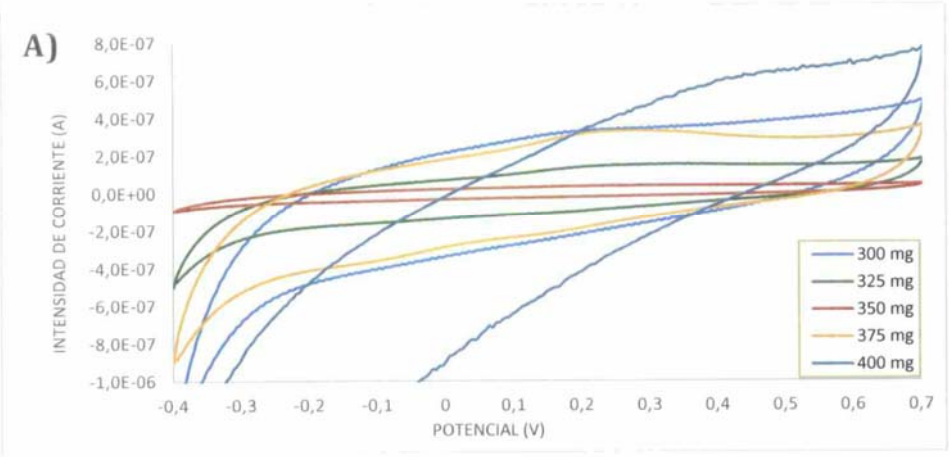


Figura 4


A)
8,0E-07
6,0E-07
4,0E-07
2,0E-07
0,0E+00
-2,0E-07
-4,0E-07
-6,0E-07
-8,0E-07
-1,0E-06
INTENSIDAD DE CORRIENTE (A)
-0,4
-0,3
-0,2
-0,1
0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
POTENCIAL (V)
300 mg
325 mg
350 mg
375 mg
400 mg

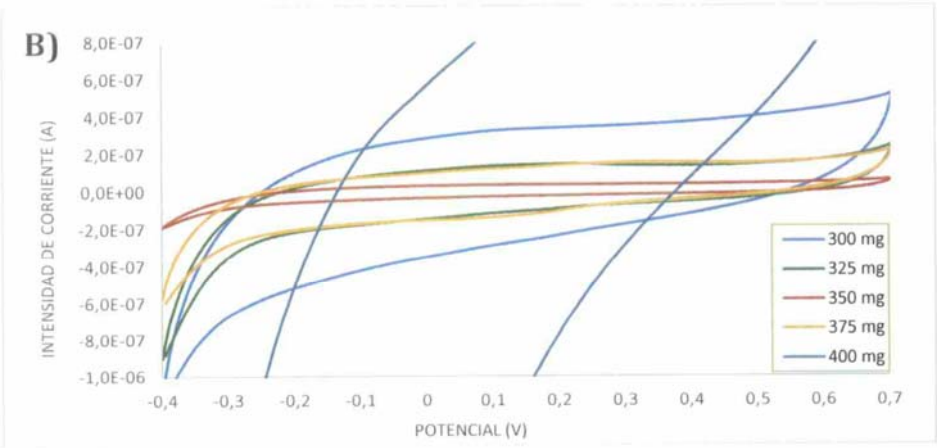

B)
8,0E-07
6,0E-07
4,0E-07
2,0E-07
0,0E+00
-2,0E-07
-4,0E-07
-6,0E-07
-8,0E-07
-1,0E-06
INTENSIDAD DE CORRIENTE (A)
-0,4
-0,3
-0,2
-0,1
0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
POTENCIAL (V)
300 mg
325 mg
350 mg
375 mg
400 mg

Figura 5

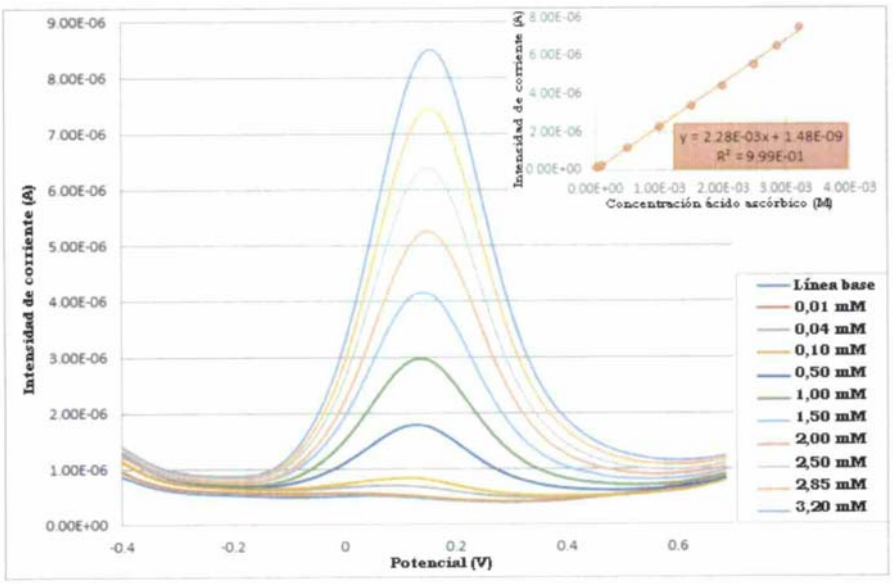

9.00E-06
8.00E-06
7.00E-06
6.00E-06
5.00E-06
4.00E-06
3.00E-06
2.00E-06
1.00E-06
0.00E+00
Intensidad de corriente (A)
-0.4
-0.2
0
0.2
0.4
0.6
Potencial (V)
Línea base
0,01 mM
0,04 mM
0,10 mM
0,50 mM
1,00 mM
1,50 mM
2,00 mM
2,50 mM
2,85 mM
3,20 mM
Intensidad de corriente (A)
8.00E-06
6.00E-06
4.00E-06
2.00E-06
0.00E+00
y = 2.28E-03x + 1.48E-09
R² = 9.99E-01
0.00E+00
1.00E-03
2.00E-03
3.00E-03
4.00E-03
Concentración ácido ascórbico (M)

Figura 6

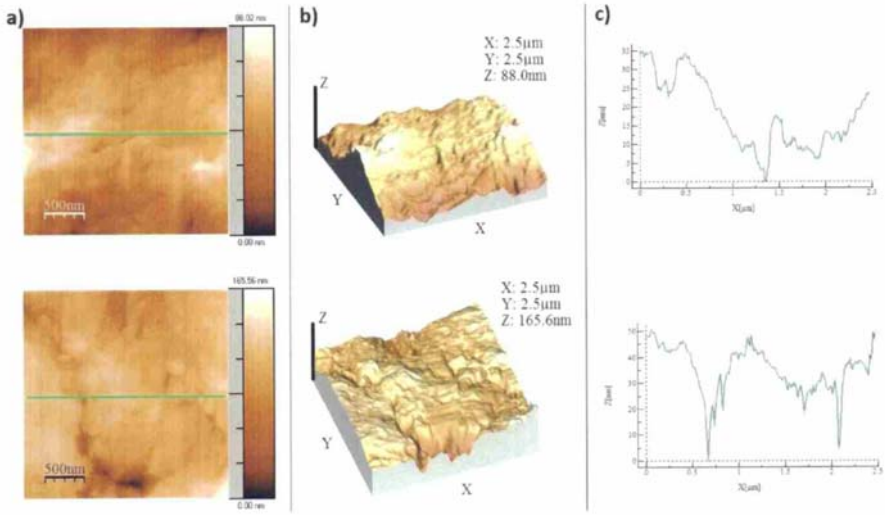

a)
500nm
500nm
b)
X: 2.5µm
Y: 2.5µm
Z: 88.0nm
Z
Y
X
X: 2.5µm
Y: 2.5µm
Z: 165.6nm
Z
Y
X
c)

Figura 7

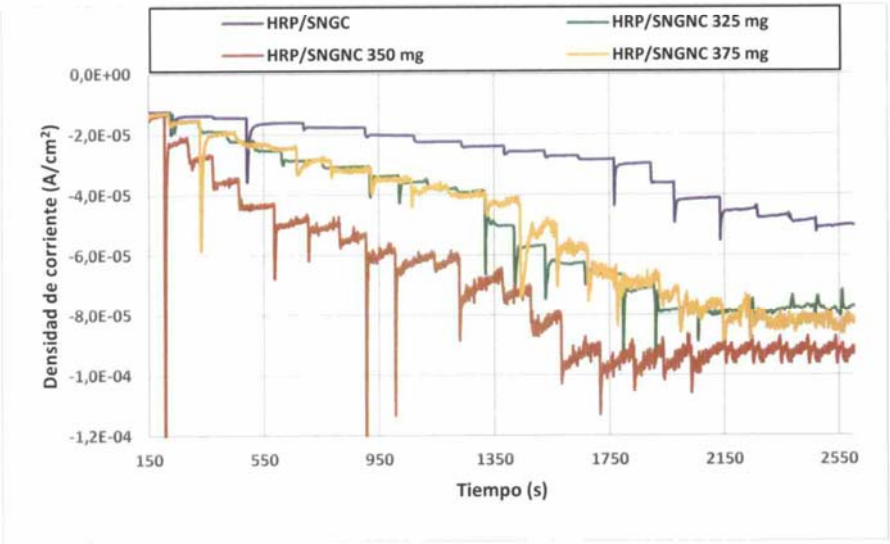

HRP/SNGC
HRP/SNGNC 325 mg
HRP/SNGNC 350 mg
HRP/SNGNC 375 mg
0,0E+00
-2,0E-05
-4,0E-05
-6,0E-05
-8,0E-05
-1,0E-04
-1,2E-04
Densidad de corriente (A/cm²)
150
550
950
1350
1750
2150
2550
Tiempo (s)

Figura 8

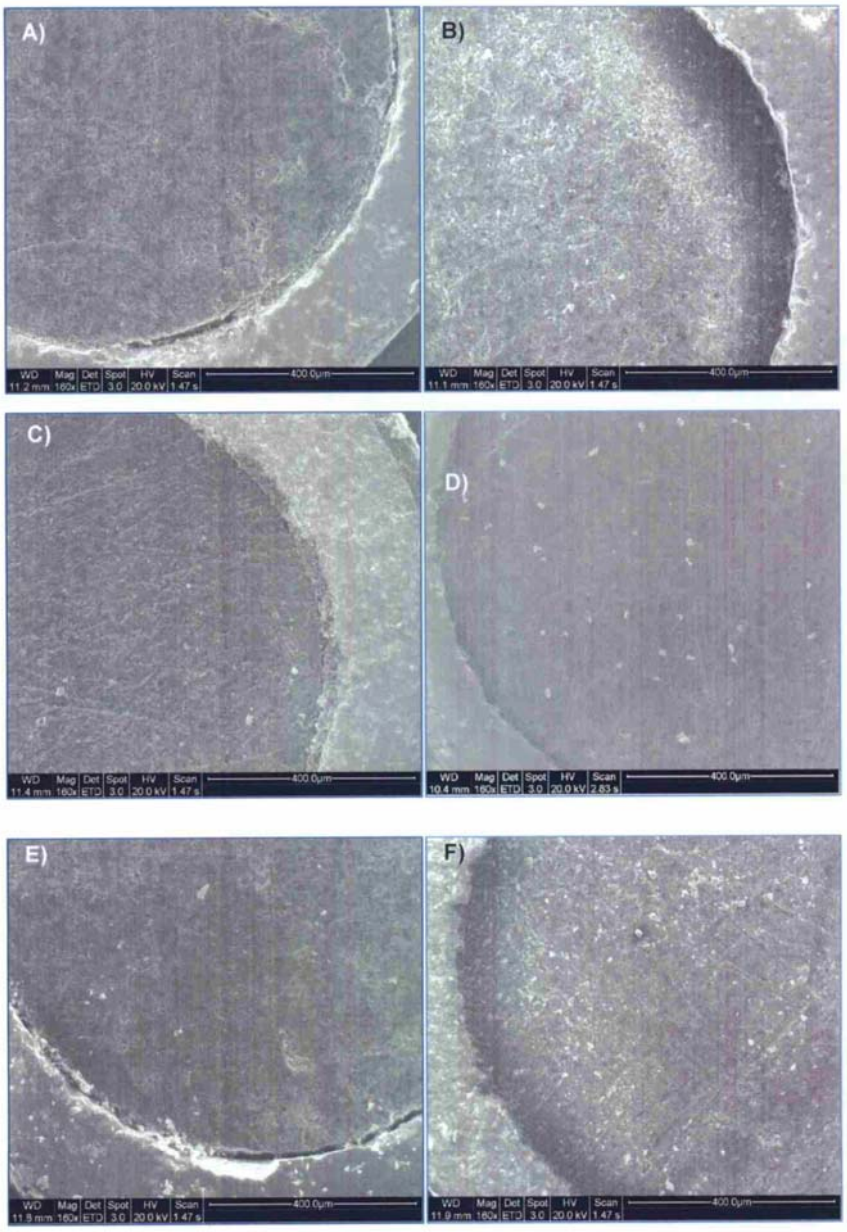


Figura 9

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201700270

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 22.03.2017

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	**(56) Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
X	GARCIA ROMERO, Magdalena. SINTESIS Y ESTUDIOS DE CARACTERIZACION PRELIMINARES DE NUEVOS MATERIALES SONOGEL MODIFICADOS CON NANOCARBON. Trabajo de Fin de Grado en Química FACULTAD DE CIENCIAS (UNIVERSIDAD DE CADIZ) 16/06/2015, Páginas 1-41 [en línea][recuperado el http://rodin.uca.es/xmlui/handle/10498/15691] Todo el documento.	1-7
Y	CUBILLANA-AGUILERA, Laura M., et al. JOURNAL OF SOL-GEL SCIENCE AND TECHNOLOGY. 22/08/2006, Vol. 40, Páginas 55-64 Todo el documento.	1-7
Y	TROJANOWICZ, Marek. Trends in Analytical Chemistry. 2006, Vol. 25, Páginas 480-489.	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	**Examinador**	**Página**
31.08.2017	V. Balmaseda Valencia	1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C01B32/15 (2017.01)
C01B33/00 (2006.01)
B82Y30/00 (2011.01)
G01N27/30 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C01B, B82Y, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.08.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		**SI**
	Reivindicaciones	1-7	**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones		**SI**
	Reivindicaciones	1-7	**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Trabajo de Fin de Grado en Química FACULTAD DE CIENCIAS (UNIVERSIDAD DE CADIZ)	16.06.2015
D02	JOURNAL OF SOL-GEL SCIENCE AND TECHNOLOGY, Vol. 40, Páginas 55-64	22.08.2006
D03	Trends in Analytical Chemistry Vol. 25, Páginas 480-489.	2006

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

NOVEDAD

Se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-7 ha sido idénticamente divulgado en el documento D01 y, por tanto, carece de novedad.

En el documento D01 se estudia la síntesis de materiales sonogel modificados con nanocarbono basada en la catálisis ácida y el empleo de ultrasonidos de alta energía. Dicha síntesis comprende preparar una mezcla precursora, que contiene 500 microlitros de metitrimetoxisilano (MTMOS) y una disolución de catalizador ácido (100 microlitros de HCl 0,2 N), aplicar ultrasonidos de alta energía a la mezcla precursora durante 10 segundos, añadir nanocarbono en distintas cantidades al sol resultante y homogeneizarlo, rellenar con dicho material un molde o capilar y secarlo durante 24h.

Así mismo, se divulga el uso del material resultante como sensores y biosensores amperométricos (todo el documento).
En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-7 carece de novedad conforme establece el Artículo 6.1 de la L.P.

ACTIVIDAD INVENTIVA

Se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-7 tampoco implicaría actividad inventiva a la vista de lo divulgado en los documentos D02-D03.

En el documento D02, considerado el estado de la técnica más cercano, se estudia la influencia del tamaño de polvo de carbono grafito en materiales sonogel-carbono para su uso como electrodos en sensores amperométricos. En concreto, se preparan materiales sonogel-carbono a partir de la mezcla de 500 microlitros de MTMOS y 100 microlitros de HCl (0.2M), la aplicación de ultrasonidos de alta energía y la adición de polvo de carbono grafito con distintos tamaños.

La diferencia entre el documento D02 y el objeto de las reivindicaciones 1-7 radica en el tamaño del carbono empleado con objeto de obtener materiales con propiedades electroquímicas mejoradas para su uso en sensores amperométricos y biosensores.

El problema técnico que subyace por lo tanto de la presente invención se puede considerar como la provisión de un material con propiedades electroquímicas mejoradas para su uso como electrodos en sensores. La solución consiste en el empleo de carbono de tamaño nanométrico.

Este problema y su correspondiente solución se encuentran recogidos en el documento D03 en el que se recogen las distintas aplicaciones en química analítica de los nanotubos de carbono basadas en sus propiedades electroquímicas mejoradas. En concreto, su aplicación en métodos amperométricos es especialmente favorable, pero también en biosensores dada su capacidad de sorción de los distintos analitos.

Sería, por tanto, obvio para un experto en la materia adicionar nanotubos de carbono en un procedimiento de preparación de materiales sonogel-carbono, como el recogido en el documento D02 para obtener, con una expectativa razonable de éxito, materiales con propiedades electroquímicas mejoradas, tal y como, se han descrito en el documento D03.

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-7 no implica actividad inventiva conforme al Artículo 8.1.