



Desarrollo de electrodos modificados con nanotubos de carbono multicapa (MWCNTs) para la determinación de polifenoles

Development of electrodes modified with multilayer carbon nanotubes (MWCNTs) for the determination of polyphenols

Desenvolvimento de eletrodos modificados com nanotubos de carbono multicamadas (MWCNTs) para determinação de polifenóis

Gabriel Alejandro Moreno-Toasa ^I
ga.morenot@uta.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0002-1976-8699>

Erika Vanessa Moya-Castillo ^{II}
evmoya1@espe.edu.ec
<https://orcid.org/0009-0001-2171-127X>

Gabriela-Elena Vizquete-Fiallos ^{III}
gevizquete@espe.edu.ec
<https://orcid.org/0009-0000-0593-6527>

Carlos Jeanpier Yagos-Arias ^{IV}
cjyagos@espe.edu.ec
<https://orcid.org/0009-0000-4978-2574>

Wilson Patricio León-Cueva ^{IV}
wleon@utmachala.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0002-5474-430X>

Correspondencia: ga.morenot@uta.edu.ec

Ciencias Técnica y Aplicadas
Artículo de Investigación

* **Recibido:** 23 de julio de 2023 * **Aceptado:** 12 de agosto de 2023 * **Publicado:** 01 de septiembre de 2023

- I. Universidad Técnica de Ambato, Ecuador.
- II. Universidad de las Fuerzas Armadas, Ecuador.
- III. Universidad de las Fuerzas Armadas, Ecuador.
- IV. Universidad de las Fuerzas Armadas, Ecuador.
- V. Universidad Técnica de Machala, Ecuador.

Resumen

El contenido de polifenoles totales puede ser estimado de forma selectiva empleando técnicas electroanalíticas como es el caso de la voltamperometría cíclica donde se elige de forma apropiada potenciales de oxidación (0.400, 0.600 y 0.800 V), para su detección con una mayor estabilidad y selectividad. En la presente investigación se desarrolló una metodología analítica utilizando un electrodo modificado con nanotubos de carbono multicapa. Para ello, se evaluó inicialmente el procedimiento de elaboración de dispersiones de MWCNTs, empleando polietilenimina como agente dispersante, y su uso para la modificación de electrodos de carbono vítreo. Las condiciones de elaboración fueron: 0.50 mg·mL⁻¹ de concentración del nanomaterial, 0.25% (m/m) de PEI, 2000 J de energía de dispersión en PEI, centrifugación (2500 rpm; 20 min) y finalmente, redisperso en agua aplicando 2000 J de energía. Estos electrodos presentan menores potenciales de oxidación, mayor intensidad de pico y menores relaciones I/C, que los electrodos no modificados. Dadas las ventajas mostradas, se desarrolló un electrodo optimizado [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)], con el fin de detectar polifenoles totales, obteniendo mejoras en la estabilidad, reproducibilidad, mayor sensibilidad y posibilidad de detección selectiva de estos compuestos. Generando una alternativa de análisis a los estudios espectrofotométricos.

Palabras Clave: Electrodos; Nanotubos de carbono (MWCNTs); Polifenoles; Voltamperometría.

Abstract

El contenido de polifenoles totales puede ser estimado de forma selectiva empleando técnicas electroanalíticas como es el caso de la voltamperometría cíclica donde se elige de forma apropiada potenciales de oxidación (0.400, 0.600 y 0.800 V), para su detección con una mayor estabilidad y selectividad. En la presente investigación se desarrolló una metodología analítica utilizando un electrodo modificado con nanotubos de carbono multicapa. Para ello, se evaluó inicialmente el procedimiento de elaboración de dispersiones de MWCNTs, empleando polietilenimina como agente dispersante, y su uso para la modificación de electrodos de carbono vítreo. Las condiciones de elaboración fueron: 0.50 mg·mL⁻¹ de concentración del nanomaterial, 0.25% (m/m) de PEI, 2000 J de energía de dispersión en PEI, centrifugación (2500 rpm; 20 min) y finalmente, redisperso en agua aplicando 2000 J de energía. Estos electrodos presentan menores potenciales de oxidación, mayor intensidad de pico y menores relaciones I/C, que los electrodos no modificados. Dadas las ventajas mostradas, se desarrolló un electrodo optimizado [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)], con el fin

de detectar polifenoles totales, obteniendo mejoras en la estabilidad, reproducibilidad, mayor sensibilidad y posibilidad de detección selectiva de estos compuestos. Generando una alternativa de análisis a los estudios espectrofotométricos.

Keywords: Electrodes; Carbon nanotubes (MWCNTs); Polyphenols; Voltammetry.

Resumo

O teor de polifenóis totais pode ser estimado seletivamente utilizando técnicas eletroanalíticas como a voltametria cíclica onde os potenciais de oxidação (0,400, 0,600 e 0,800 V) são adequadamente selecionados para sua detecção com maior estabilidade e seletividade. Na presente investigação foi desenvolvida uma metodologia analítica utilizando um eletrodo modificado com nanotubos de carbono multicamadas. Para tanto, foi inicialmente avaliado o procedimento de confecção de dispersões de MWCNTs, utilizando polietilenoimina como agente dispersante, e sua utilização para modificação de eletrodos de carbono vítreo. As condições de fabricação foram: concentração de 0,50 mg·mL⁻¹ do nanomaterial, 0,25% (m/m) de PEI, 2.000 J de energia de dispersão em PEI, centrifugação (2.500 rpm; 20 min) e por fim, redisperso em água. 2.000 J de energia. Esses eletrodos têm potenciais de oxidação mais baixos, intensidade de pico mais alta e relações I/C mais baixas do que eletrodos não modificados. Dadas as vantagens apresentadas, foi desenvolvido um eletrodo otimizado [GCE(PEI-Água/MWCNTs)], com o objetivo de detectar polifenóis totais, obtendo melhorias na estabilidade, reprodutibilidade, maior sensibilidade e possibilidade de detecção seletiva destes compostos. Gerando uma alternativa de análise aos estudos espectrofotométricos.

Palavras-chave: Eletrodos; Nanotubos de carbono (MWCNTs); Polifenóis; Voltametria.

Introducción

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por grupos funcionales hidroxilo (Hernández, & Prieto; 1999), siendo los flavonoides el grupo mejor definido entre los polifenoles de la dieta humana.

Los polifenoles, especialmente aquellos que se encuentran naturalmente en los alimentos, son sustancias de creciente interés como resultado de sus propiedades biológicas como las actividades anti-oxidantes, anti-trombóticas, anti-bacterianas, anti-alérgicas y anti-inflamatorias (Hurtado-

Fernández et al.; 2010). Como consecuencia de sus efectos benéficos en la salud humana (Cifuentes; 2006) y (Kris-Etherton et al., 2002), se recomienda la inclusión de alimentos ricos en polifenoles en hábitos alimenticios, como nuevos suplementos dietéticos y alimentos funcionales. El aporte principal a la dieta de este tipo de compuestos es realizado por aquellos alimentos de origen vegetal, dado a su alto contenido polifenólico. Entre ellos, el vino es uno de los más representativos por la riqueza y variedad de sus componentes. Los compuestos fenólicos del vino incluyen a los ácidos fenólicos, por ejemplo: cumárico, cinámico, cafeíco, gálico y ferúlico; además de flavonoides (catequina, quercitina entre otros), los cuales son sintetizados por una vía metabólica común a partir de la fenilalanina (Soleas et al., 1997). Por ello, resulta de elevado interés el desarrollo de metodologías de análisis que permitan cuantificar el contenido total de polifenoles en los alimentos (Jackson; 2008).

Las técnicas electroanalíticas resultan adecuadas para el análisis de polifenoles, ya que muchos de estos compuestos pueden ser oxidados electroquímicamente a potenciales moderados. Este comportamiento electroquímico puede estar relacionado con las propiedades antioxidantes y su capacidad para donar electrones. Estas características permiten una detección electroquímica de polifenoles con cierta selectividad y buena sensibilidad, incluso en muestras complejas como el vino. El uso de estas técnicas presenta algunas ventajas frente a las metodologías espectrofotométricas de análisis de polifenoles, como es la independencia de la señal frente a la longitud de paso óptico o la turbidez de la muestra (Blasco et al., 2007). Estas ventajas han llevado a la consideración de técnicas electroanalíticas como alternativas atractivas para el análisis de polifenoles.

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es el desarrollo de un electrodo modificado con nanotubos de carbono multicapa (MWCNTs) para la determinación de polifenoles.

Metodología

Reactivos y muestras

Los ácidos: gálico, ferúlico, cafeíco y p-cumárico, y la catequina se adquirieron de Sigma- Aldrich (Madrid, España). Las disoluciones madre de polifenoles se prepararon disolviendo una cantidad apropiada del compuesto en metanol (grado ambiental, Alfa Aesar, Barcelona, España). Todas las disoluciones madre se mantuvieron alejadas de la luz y se almacenaron bajo refrigeración. Se prepararon disoluciones diluidas diariamente a partir de estas disoluciones madre. La

polietilenimina (PEI, Cat. No. P3143) se adquirió de Sigma (Madrid, España) y se disolvió en etanol: agua, Scharlau (Sentmenat, España). La disolución reguladora (Tampón Acético/Acetato 0.10 M pH 4.5 conteniendo NaCl 100 mM) se preparó tomando un volumen apropiado de ácido acético glacial (densidad = $1.05 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-1}$; 99.8% pureza; Scharlau, Sentmenat-España), añadiendo la masa correspondiente de NaCl, Panreac (Barcelona, España), posteriormente ajustando el pH 4.5 deseado con NaOH (Ródano, Italia) 1.0 M y llevándolo a un volumen final con agua ultrapura. Todos los demás productos químicos fueron de grado analítico-reactivo. Se utilizó agua ultrapura ($r > 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) de un sistema Elga Purelab Opción Q (ELGA LabWater, UK) para preparar todas las disoluciones.

Los nanotubos de carbono multicapa en polvo (MWCNTs, $30\pm 15 \text{ nm}$ de diámetro, $5\text{-}20 \mu\text{m}$ de longitud, pureza $>95\%$ (m/m), tipo "tubo hueco", preparado por deposición química en fase vapor, con un contenido nominal de 1% (m/m) de Fe y 0.1% (m/m) de S, Lote. PD30L520-60805) se obtuvieron de NanoLab (MA, EE. UU.).

Instrumentación

Las imágenes de la superficie del electrodo se tomaron empleando un microscopio digital (Modelo RK-10, Dino-lite, Taiwan) controlado por un software DINO CAPTURE 2.0.

Las mediciones espectrofotométricas se llevaron a cabo utilizando un espectrofotómetro de doble haz (Jasco V-630, Japón), controlado por el software SPECTRA MANAGER 2.08.04.

Los tratamientos de ultrasonidos para la preparación de las dispersiones se realizaron empleando una sonda de ultrasonido Sonics Vibra Cell (modelo VCX130; Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, EE. UU.).

Procedimiento de medida

Análisis electroquímicos

Los experimentos de voltamperometría cíclica se llevaron a cabo utilizando una celda electroquímica con tres electrodos. Se emplearon diferentes electrodos de trabajo (GCE y GCE modificado), un electrodo Ag/AgCl/NaCl 3M (BAS MF-2063) como electrodo de referencia y un alambre de platino (1 mm de diámetro) como electrodo auxiliar. Los electrodos de GCE se pulieron con alúmina de 0.3 y $0.05 \mu\text{m}$ (Buehler, España) sobre una alfombra de pulido N° 407212 (Buehler, EE. UU.) y se sometieron a limpieza ultrasónica en agua durante 1 minuto antes de su uso. Mientras

que, los GCE modificados se obtuvieron depositando el volumen apropiado de la dispersión de MWCNTs sobre la superficie GCE limpia y dejándola secar durante 24 horas a temperatura ambiente. Además, los GCE modificados se sometieron a 10 ciclos entre -0.20 y +1.10 V a $0.050\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ en el electrolito soporte antes de cada experimento (Blasco et al., 2007).

Análisis espectrofotométricos

Para realizar las medidas espectrofotométricas de las dispersiones de MWCNTs preparadas, estas se diluyeron previamente en agua (dilución 1:100). Las medidas se llevaron a cabo en cubetas de cuarzo (0.2 cm de paso óptico) y finalmente se registraron los espectros a longitud de onda comprendida entre 200 y 600 nm. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente entre 20-25 °C.

Resultados y discusión

Optimización de dispersiones de nanotubos de carbono para modificación de electrodo de carbón vítreo (GCE).

- **Elección de polímero de dispersión**

En este trabajo se procedió a la modificación de GCE con una película de nanotubo de carbono (MWCNTs), dado que este tipo de modificaciones permite la detección electroquímica de polifenoles con mayor estabilidad y selectividad. Para estas modificaciones es necesario partir de una dispersión estable de nanotubos de carbono, la cual se depositó sobre la superficie del electrodo GCE, buscando obtener un recubrimiento completo y homogéneo en la superficie base. Es por ello y basándose en estudios previos del grupo de investigación (Singleton et al., 1974), se iniciaron los estudios a partir de dispersiones de MWCNTs en disoluciones del polímero catiónico polietilenimina (PEI).

- **Estudio de condiciones de dispersión y modificación de superficie de electrodo.**

Los primeros estudios se realizaron para obtener una dispersión de MWCNTs adecuada para la modificación de las superficies de GCE. Para ello se parte de unas condiciones de preparación de dispersiones basadas en estudios previos realizadas por el grupo de investigación de Sánchez *et al.*, (2013).

Todas las dispersiones preparadas se caracterizaron mediante medidas espectrofotométricas, voltamperométricas, así como obteniendo imágenes de superficie de los electrodos GCE y GCE

modificado, empleando un microscopio digital. Se buscaron dispersiones estables en el tiempo, recubrimientos de electrodos completos y homogéneos con mejoras en las respuestas electroquímicas de polifenoles (ácido gálico) respecto al electrodo base (GCE). Se tomó el ácido gálico como polifenol de referencia ya que el contenido de polifenoles se expresa generalmente referido a este polifenol Sánchez *et al.*, (2012). Por otro lado, se evaluaron también la influencia de la concentración de MWCNTs y PEI, así como etapas en el procedimiento de dispersión tales como: centrifugación, re-dispersión y energía de ultrasonido.

En primera instancia, se prepararon dispersiones de MWCNTs con diferente concentración (0.25, 0.50, 0.75 y 1.0 mg·mL⁻¹) en PEI (0.25% m/m, en etanol-agua 50:50). Para ello se pesaron la cantidad correspondiente de MWCNTs y se añadieron 4.00 mL de PEI. A continuación, se sometieron a tratamiento de ultrasonido aplicando una energía de 2000 J. Se obtuvieron dispersiones incompletas, observándose aglomeraciones de nanotubos que sedimentaron con el transcurso de tiempo en todos los casos siendo este efecto más acusado a concentraciones por encima de 0.50 mg·mL⁻¹.

A continuación, se registraron los correspondientes espectros *UV-vis* de las dispersiones diluidas. Todos ellos mostraron un máximo de absorbancia a 273 nm, este perfil es similar a los expresados por Wang *et al.*, (2008). En la figura 1, se muestra una representación gráfica de la absorbancia en las dispersiones a la longitud de onda de su máximo de absorbancia frente a la concentración de nanotubos de carbono.

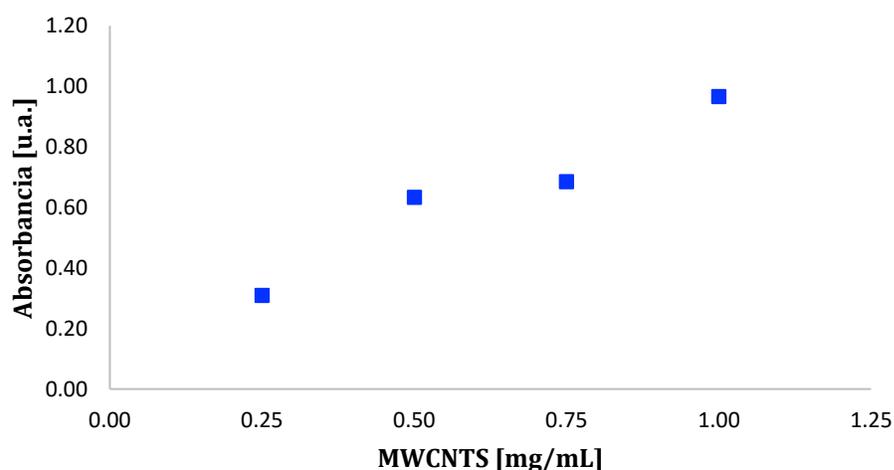


Figura 1. Absorbancia vs. Concentración dispersión de MWCNTs en PEI a 273 nm.

Se observó linealidad de la absorbancia frente a la concentración de MWCNTs hasta una concentración de $0.50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Estos resultados tienen cierta correspondencia con el aspecto físico de las dispersiones, descrito anteriormente y podrían estar relacionados con la efectividad en la dispersión del nanomaterial durante la preparación de estas. Al aumentar la cantidad del nanomaterial inicial, hay mayor dificultad para su dispersión completa, resultando una absorbancia menor a la esperada.

A continuación, se modificaron los GCE, con las dispersiones de MWCNTs preparadas. Para ello se añadieron $15 \mu\text{L}$ de las mismas sobre la superficie del electrodo y se dejó secar toda la noche a temperatura ambiente. En la figura 2, se muestran las imágenes de la superficie de los electrodos modificados [GCE(PEI/MWCNTs)] con una magnificación de 225 aumentos.

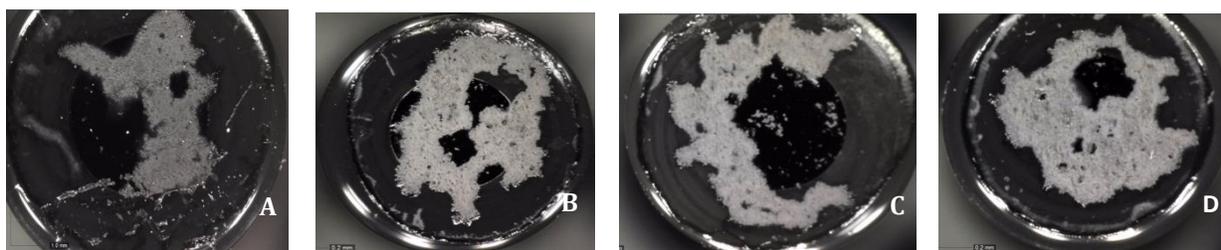


Figura 2. Imágenes de superficie GCE (PEI/MWCNTs) a 225 aumentos. **A:** $0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; **B:** $0.50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; **C:** $0.75 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y **D:** $1.00 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Se puede observar que no existió homogeneidad en el recubrimiento total de la superficie del electrodo GCE por parte de los nanotubos de carbono (MWCNTs) y su tendencia es ir hacia los bordes externos donde se encuentra el material plástico (Teflón) que forma parte de este electrodo. Esto parece ser debido a la hidrofobicidad de MWCNTs y la presencia de aglomerados.

Por último, se evaluó la respuesta electroquímica de los electrodos GCE y GCE(PEI/MWCNTs). Para ello, se realizaron medidas por voltamperometría cíclica (CV) en disoluciones de ácido gálico $1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$, en disolución tampón (acético/acetato 0.10 M), la cual contiene $\text{NaCl } 0.10 \text{ M}$, $\text{pH } 4.5$ y una velocidad de barrido de $0.050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. En la figura 3, se muestra los voltamperogramas cíclicos obtenidos y en la tabla 1, se muestran los valores medios de los potenciales de pico de oxidación (mV) y sus intensidades de corriente (μA), así como su desviación estándar relativa (RSD) como resultado de las medidas realizadas con 3 superficies de electrodo diferente.

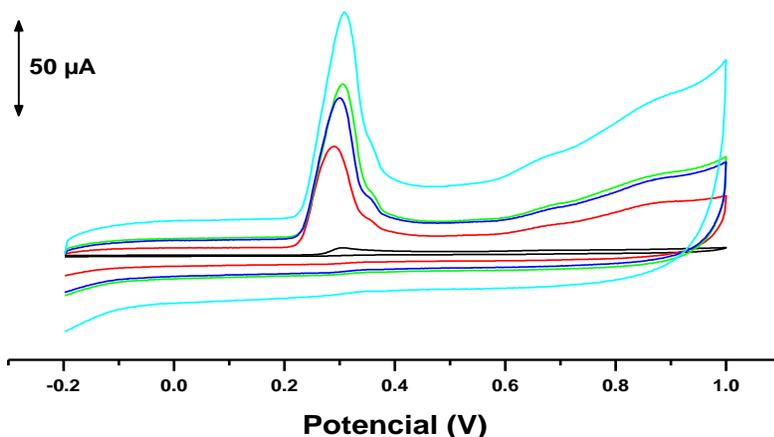


Figura 3. Voltamperométricas cíclicas de ácido gálico 1.00×10^{-4} M obtenidos con diferentes electrodos de trabajo: GCE (negro) y GCE modificado con MWCNTs a diferente concentración: $0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (rojo), $0.50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (verde), $0.75 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (azul) y $0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (cyan).

Tabla 1. Resultados voltamperométricos cíclicos de ácido gálico 1.00×10^{-4} M obtenidos para GCE y GCE (PEI/MWCNTs) a concentraciones de: 0.25, 0.50, 0.75 y $1.00 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Los resultados son la media ($n=3$) \pm desviación estándar.

Electrodo	MWCNTs [$\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$]	Potencial E [mV]	Intensidad I [μA]	RSD**
GCE	-----	0.318 ± 0.02	3.4 ± 0.6	19
GCE (PEI/MWCNTs)	0.25	0.288 ± 0.003	46 ± 6	13
GCE (PEI/MWCNTs)	0.50	0.30 ± 0.01	76 ± 4	5
GCE (PEI/MWCNTs)	0.75	0.31 ± 0.01	97 ± 21	21
GCE (PEI/MWCNTs)	1.0	0.31 ± 0.01	128 ± 26	20

** RSD calculados para valores de intensidad.

Como se puede observar en los resultados, la presencia de MWCNTs en la superficie del electrodo aumenta considerablemente la señal de intensidad del ácido gálico con respecto al GCE sin modificar. Además, se observó una disminución en el potencial necesario para el comienzo de la oxidación del ácido gálico en presencia de MWCNTs. Se observó también un incremento en la señal capacitativa a concentraciones superiores de nanotubos de carbono (0.75 y $1.00 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Por otra parte, se observó un aumento en la variabilidad en las señales de intensidad de corriente para concentraciones de MWCNTs (0.75 y $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), esto puede estar relacionado al aumento en la dificultad para dispersar totalmente el nanomaterial al aumentar su concentración, en las condiciones empleadas, de acuerdo a lo que se ha observado en los estudios espectrofotométricos (Fig. 1).

Con el fin de mejorar la dispersión del nanomaterial y así recubrimientos y superficies más homogéneos se procedió a centrifugar (2500 rpm , 20 min) la dispersión de MWCNTs a una concentración de $0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, eliminando el sobrenadante polimérico (PEI) y agregando agua ultrapura (4.0 mL) efectuando de esta manera la redispersión de MWCNTs en agua, con un tratamiento de ultrasonido aplicando una energía de 2000 J . Como resultado de este procedimiento se obtuvieron dispersiones completas de MWCNTs con aspecto muy parecido a una tinta, en el cual no se observaron aglomeraciones por parte de los nanotubos de carbono, y además fueron estables en el tiempo.

A continuación, se depositaron diferentes volúmenes ($15 \mu\text{L}$; $10 \mu\text{L}$ y $5 \mu\text{L}$) de la dispersión de MWCNTs obtenida sobre la superficie [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)]. En la figura 4, se muestra las imágenes de superficies de los electrodos modificados [GCE (PEI/MWCNTs)] y [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)].

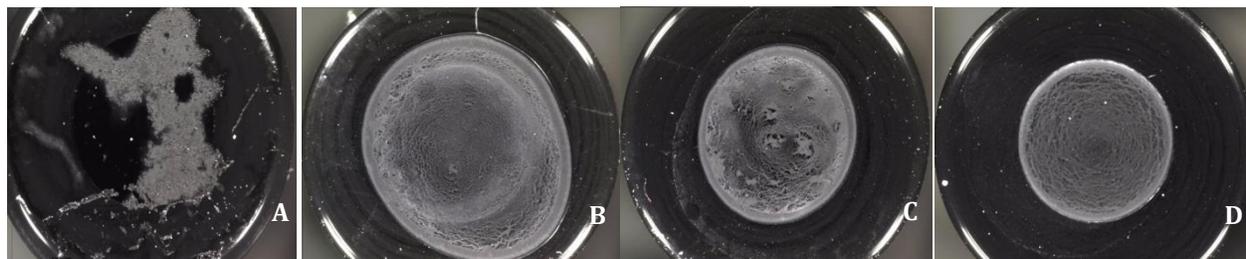


Figura 4. Imágenes de superficies a 225 aumentos de electrodos GCE modificados con $15 \mu\text{L}$ de (PEI/MWCNTs); **B:** $15 \mu\text{L}$ de (PEI-Agua/MWCNTs); **C:** $10 \mu\text{L}$ de (PEI-Agua/MWCNTs); y **D:** $5 \mu\text{L}$ de (PEI-Agua/MWCNTs) [MWCNTs]= $0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

Se observaron que las superficies modificadas con la dispersión (PEI-Agua/MWCNTs), da lugar a recubrimientos más completos y homogéneos en el área activa del electrodo que la observada con la dispersión (PEI/MWCNTs). Es por ello que únicamente fue necesario depositar $5 \mu\text{L}$ de dispersión de MWCNTs para obtener una superficie aparente cubierta. Esto podría estar

relacionado con la mejora de la dispersión del nanomaterial y una posible disminución de la hidrofobicidad de la dispersión.

De igual manera, se analizó la respuesta voltamperométrica de cada uno de los electrodos [GCE(PEI/MWCNTs)] y [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)] hacia ácido gálico 1.00×10^{-4} M a $0.050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$, siguiendo la metodología descrita anteriormente. La figura 5, muestra los voltamperogramas cíclicos obtenidos.

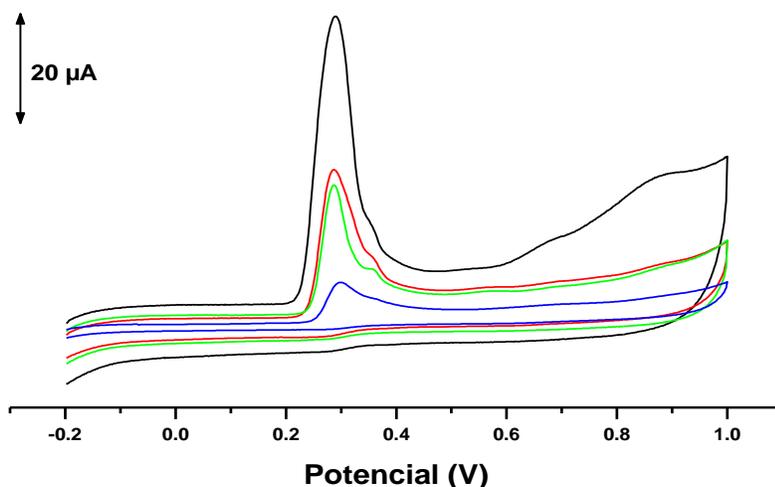


Figura 5. Señales voltamperométricas cíclicas de ácido gálico 1.00×10^{-4} M a $0.05 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ obtenidos con electrodos de GCE modificados con: **Línea negra:** $15 \mu\text{L}$ de [GCE (PEI-Agua/MWCNTs)]; **Línea roja:** $15 \mu\text{L}$ de [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)]; **Línea verde:** $10 \mu\text{L}$ de [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)]; y **Línea azul** $5 \mu\text{L}$ de [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)]. [MWCNTs] = $0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

Los resultados mostraron que la intensidad de corriente de pico (I) y corriente capacitativa (C) obtenidos con los electrodos [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)] es menor que [GCE (PEI/MWCNTs)], mientras que la relación (I/C), correspondiente a Intensidad de pico (μA)/corriente capacitativa (μA) es mayor al utilizar [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)]. Es por esta razón que se procedió a rehacer el estudio de la concentración de MWCNTs en la dispersión incluyendo la etapa de redispersión en agua.

En primera instancia, se prepararon dispersiones de MWCNTs con diferente concentración: 0.25; 0.50; 0.75 y $1.00 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en PEI (0.25% m/m, en etanol-agua 50:50). Para ello, se pesó la cantidad

correspondiente de MWCNTs y se añadieron 4.0 mL de PEI. Inmediatamente, se sometieron estas dispersiones a un tratamiento de ultrasonido de 2000 J. Posteriormente, se centrifugó a 2500 rpm por 20 min, eliminando el sobrenadante polimérico (PEI) y agregando agua ultrapura (4.0 mL), redispersando los MWCNTs al aplicar un tratamiento de ultrasonido de 2000 J de energía.

Al incluir esta etapa de redispersión se consiguieron dispersiones más completas (PEI-Agua/MWCNTs), donde la fluidez y distribución de los MWCNTs es alta, además no se observaron aglomeraciones de nanotubos de carbono en la matriz de estas nuevas dispersiones obtenidas. Por otro lado, se registraron los correspondientes espectros *UV-vis* de las dispersiones preparadas (PEI-Agua/MWCNTs). En todos los espectros se observó un máximo de absorbancia a 273 nm, al igual que en las dispersiones (PEI/MWCNTs). En la figura 6, se representa la absorbancia obtenida a 273 nm de dispersiones (PEI-Agua/MWCNTs) frente a la concentración de MWCNTs correspondiente.

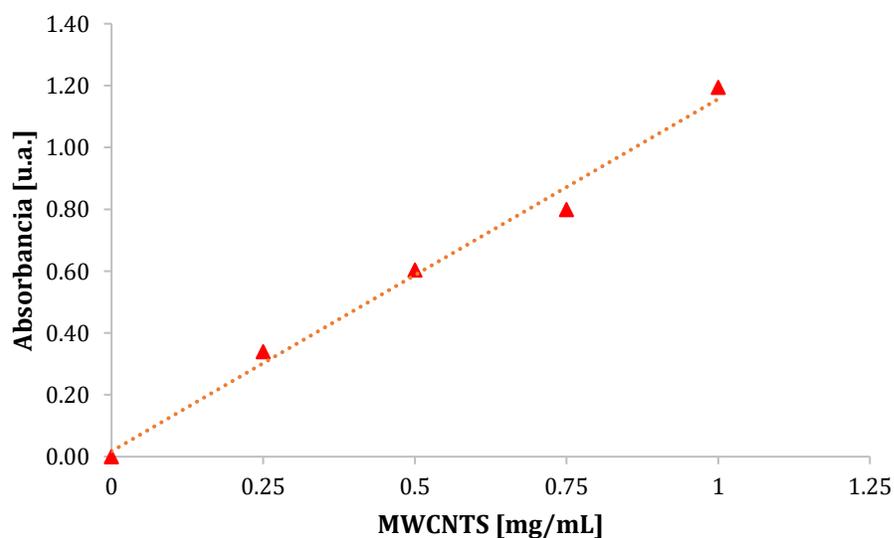


Figura 6. Absorbancia frente a concentración de MWCNTs en dispersiones (PEI-Agua/MWCNTs) obtenidas a 273 nm.

Los resultados mostraron una tendencia lineal de la absorbancia frente a la concentración de MWCNTs para todo el intervalo de estudio. Este resultado podría estar asociado a la mejora en la dispersión del material nanoestructurado. Continuando con los estudios, se modificaron electrodos de GCE con dispersiones (PEI-Agua/MWCNTs) previamente preparadas. Se depositaron 5 μ L de estas dispersiones sobre la superficie del GCE, dejando evaporar el líquido dispersante (agua) durante 12 horas a temperatura ambiente. Las imágenes de superficie con una magnificación a 225

aumentos obtenidas de los electrodos GCE y [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)] se representaron en la figura 7.

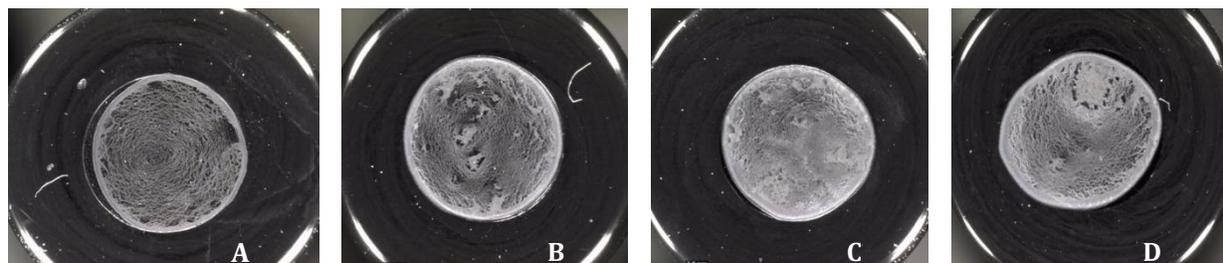


Figura 7. Imágenes a 225 aumentos de GCE modificadas con 5 μL de dispersiones (PEI-Agua/MWCNTs) conteniendo: 0.25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (A), 0.50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (B), 0.75 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (C) y 1.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (D).

Se puede observar que el área activa del electrodo queda recubierta en gran medida y de forma más homogénea. En este caso no se aprecia mayor recubrimiento sin tendencia a irse a los bordes externos tal como ocurría en las dispersiones (PEI/MWCNTs). En la figura 8, se muestra los voltamperogramas cíclicos de los electrodos modificados con estas dispersiones para ácido gálico $1.00 \times 10^{-4} \text{ M}$ a $0.050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$, siguiendo la metodología descrita en los apartados anteriores. De igual forma en la tabla 2, se mostraron los valores medios de intensidad de corriente de pico (μA), corriente capacitativa (μA), así como la relación intensidad de pico/corriente capacitativa (I/C), obtenida en la repetición del análisis con 3 superficies diferentes de electrodo.

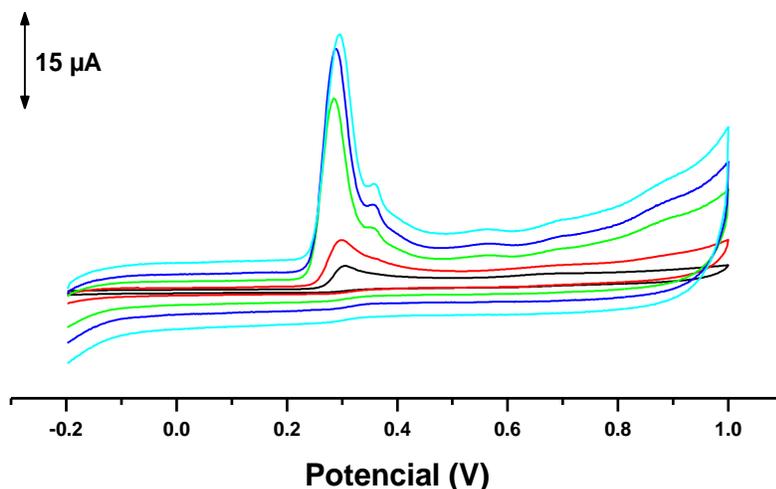


Figura 8. Señales voltamperométricas cíclicas de ácido gálico 1.00×10^{-4} M a $0.050 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ en GCE (Negro) y GCE modificada con $5 \mu\text{L}$ de dispersiones (PEI-Agua/MWCNTs) conteniendo: 0.25 (Rojo), 0.50 (Verde), 0.75 (Azul) y $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Cyan) de MWCNTs.

Tabla 2. Resultados voltamperométricos cíclicos de ácido gálico 1.00×10^{-4} M a $0.050 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ en GCE y GCE (PEI-Agua/MWCNTs) a concentraciones: 0.25, 0.50, 0.75 y $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Electrodo	MWCNTs [$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$]	Potencial E [mV]	Intensidad I [μA]	Corriente capacitativa [μA]	I/C
GCE	-----	0.318 ± 0.02	3.4 ± 0.6	0.16 ± 0.3	21 ± 2
GCE (PEI-Agua/MWCNTs)	0.25	0.295 ± 0.005	7 ± 1	0.7 ± 0.04	10 ± 2
GCE (PEI-Agua/MWCNTs)	0.50	0.286 ± 0.001	29 ± 1	1.6 ± 0.04	18 ± 0.8
GCE (PEI-Agua/MWCNTs)	0.75	0.291 ± 0.001	26 ± 3	2.8 ± 0.1	9 ± 1.2
GCE (PEI-Agua/MWCNTs)	1.0	0.291 ± 0.004	35 ± 2	4.8 ± 0.1	7 ± 0.4

Los resultados son la media ($n=3$) \pm desviación estándar.

Se puede observar en estos resultados, que al incrementar la concentración del nanomaterial presente en la modificación del GCE (PEI-Agua/MWCNTs) aumenta la señal de intensidad de corriente del ácido gálico 1.0×10^{-4} M a $0.05 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ y a su vez su corriente capacitativa. Por otro lado, a una concentración de $0.50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de MWCNTs se observó que la relación (I/C) correspondiente a la intensidad de corriente de pico/corriente capacitativa fue mayor que en el resto de las concentraciones, obteniéndose una buena reproducibilidad [RSD ($0.50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) $< 3.4\%$, $n=3$ en cuanto a intensidad de señal de oxidación de ácido gálico.

Con el propósito de optimizar estas dispersiones (PEI-Agua/MWCNTs), se estudió la energía de ultrasonido en el proceso de dispersión de los MWCNTs en PEI. Para ello se aplicaron energías de ultrasonido de: 1000; 2000 y 3000 J. Continuando con el proceso, se centrifugó eliminando el

sobrenadante polimérico (PEI) y se agregaron 4.0 mL de agua ultrapura generando su redispersión, donde finalmente se aplicó una energía de ultrasonido de 2000 J. La concentración de MWCNTs empleada en este estudio fue de $0.50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

En la figura 9, se observaron los voltamperogramas cíclicos de ácido gálico $1.00 \times 10^{-4} \text{ M}$ obtenidos para GCE modificados con estas nuevas dispersiones (PEI-Agua/MWCNTs). Además, en la tabla 3, se muestran los valores medios de potencial de oxidación (mV), intensidad de corriente de pico (μA), corriente capacitativa (μA), así como la relación intensidad de pico/Corriente capacitativa, como resultados del análisis con 3 superficies diferentes de electrodo.

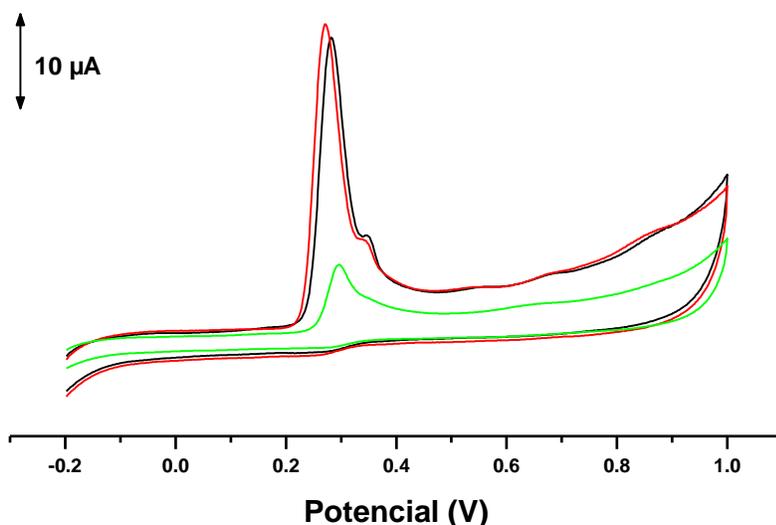


Figura 9. Señales voltamperométricas cíclicas de ácido gálico $1.00 \times 10^{-4} \text{ M}$ a $0.050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$, a diferentes energías de ultrasonido en la etapa de elaboración de dispersiones (PEI-Agua/MWCNTs). **Línea negra:** 1000 J en GCE (PEI-Agua/MWCNTs); **Línea roja:** 2000 J en GCE (PEI-Agua/MWCNTs); y **Línea verde:** 3000 J en GCE (PEI-Agua/MWCNTs).

Tabla 3. Resultados de voltamperometría cíclica obtenidos a diferentes energías de ultrasonido en dispersión GCE (PEI-Agua/MWCNTs).

Dispersión	Energía [Julios]	Potencial E [mV]	Intensidad I [μA]	Corriente capacitativa C [μA]	I/C
(PEI-Agua/MWCNTs)	1000 J	0.29 ± 0.01	30 ± 10	1.4 ± 0.3	22 ± 2

(PEI-Agua/MWCNTs)	2000 J	0.28±0.01	27±6	1.1±0.2	24±4
(PEI-Agua/MWCNTs)	3000 J	0.27±0.02	8±7	0.8±0.3	14±15

Los resultados son la media (n=3) ± desviación estándar.

A la vista de estos resultados, parece que 1000 J no permiten una interacción PEI:MWCNTs suficiente para posteriormente una redispersión efectiva del nanomaterial, mientras que 3000 J hacen que una mayor cantidad de MWCNTs se dispersen inicialmente en el sobrenadante y, después de centrifugar, menos cantidad de nanomaterial es redispersado. Como consecuencia se evaluó la influencia de la concentración (0.25, 0.12, 0.06, 0.025 y 0.012 % m/v, en etanol-agua 50:50) del polímero dispersante (PEI), en el tratamiento inicial donde aplicó 2000 J de energía de ultrasonido. Se registraron los espectros de absorción de estas dispersiones iniciales (PEI/MWCNTs) y en la tabla 4, se muestran las absorbancias obtenidas en su máximo a 273 nm.

Tabla 4. Resultados espectrofotométricos obtenidos a 273 nm en dispersiones GCE (PEI/MWCNTs) a diferentes concentraciones de dispersante polimérico (PEI).

Concentración de PEI [% m/m]	Absorbancia [u.a.]
0.25	<u>0.68</u>
0.12	0.60
0.06	<u>0.77</u>
0.025	0.77
0.012	0.65

Teniendo en cuenta que los valores de absorbancia obtenidos fueron muy similares entre sí, no se observó una clara influencia de la concentración de PEI en la eficacia de la dispersión. Con el fin de comprobar si se veían diferencias en las redispersiones en agua se procedió a volver a redispersar las dispersiones preparadas con 0.06 y 0.25% de PEI siguiendo el procedimiento empleando hasta el momento. Posteriormente se depositaron 5 µL de dichas dispersiones sobre superficies de electrodos de GCE para proceder a medir la señal voltamperométrica del ácido gálico 1.0×10^{-4} M a $0.050 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

En la tabla 5, se presentaron los valores de absorbancia obtenidos a 273 nm de dichas dispersiones (PEI-Agua/MWCNTs), además de los valores medios de las señales de potencial de pico (mV), intensidad de corriente de pico (μA), corriente capacitativa (μA) y relación (I/C) de intensidad de corriente de pico/corriente capacitativa medidos en ácido gálico 1.00×10^{-4} M, producto de las medidas de señales obtenidas con 3 electrodos diferentes.

Tabla 5. Resultados espectrofotométricos a 273 nm de las dispersiones y valores voltamperométricos cíclicos de ácido gálico 1.00×10^{-4} M, obtenidos en [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)].

Dispersión	PEI [% m/m]	Abs [u.a.]	Potencial E [mV]	Intensidad I [μA]	Corriente capacitativa C [μA]	I/C
(PEI-Agua/MWCNTs)	0.25	0.76	0.281±0.001	32±2	2±0,3	22±4
(PEI-Agua/MWCNTs)	0.06	0.69	0.29±0.01	26±12	8±2	4±3

Los resultados son la media (n=3) \pm desviación estándar.

Al igual que en el estudio anterior con valores de absorbancia obtenidos fueron muy similares. En cuanto a los resultados voltamperométricos se obtuvieron una mayor variabilidad en las señales, así como una mayor corriente capacitativa en el caso de las dispersiones preparadas con menor concentración del polímero, por lo que se procedió a continuar con los estudios utilizando una concentración de PEI de 0.25 % (m/m).

Finalmente, para conseguir perfeccionar la metodología de desarrollo de un sensor electroquímico, se estudió la energía de ultrasonido aplicada en el proceso de re-dispersión en agua. Las energías de ultrasonido estudiadas fueron: 2000, 3000 y 4000 J. Para ello se elaboraron dispersiones de MWCNTs a $0.50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ siguiendo la metodología descrita en estudios anteriores. Finalmente, se midió la absorbancia de las dispersiones preparadas y a continuación, se depositaron $5 \mu\text{L}$ sobre GCE para posteriormente medir la señal de ácido gálico al igual que en estudios previos.

En la tabla 6, se muestran los valores de los espectros de absorbancia medidos a 273 nm en dispersiones (PEI-Agua/MWCNTs), además de los valores medios de las señales de potencial de

oxidación (mV), intensidad de corriente de pico (μA), corriente capacitativa (μA) y relación (I/C) de intensidad de corriente de pico/corriente capacitativa medidos en ácido gálico 1.00×10^{-4} M, producto de las medidas de 3 electrodos diferentes de [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)].

Tabla 6. Resultados espectrofotométricos y voltamperométricos a diferentes energías de ultrasonido: 2000; 3000 y 4000 J en [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)].

Electrodo	Energía [Julios]	Abs [u.a.]	Potencial E [mV]	Intensidad I [μA]	Corriente capacitativa C [μA]	I/C
GCE (PEI-Agua/MWCNTs)	2000 J	0.76	0.288 ± 0.003	50 ± 8	2.5 ± 0.2	20 ± 1
GCE (PEI-Agua/MWCNTs)	3000 J	0.75	0.284 ± 0.001	38 ± 5	1.9 ± 0.3	21 ± 6
GCE (PEI-Agua/MWCNTs)	4000 J	0.62	0.281 ± 0.001	33 ± 3	1.2 ± 0.2	27 ± 5

Los resultados son la media ($n=3$) \pm desviación estándar.

En base a los resultados obtenidos, se llegó a la conclusión que no existieron diferencias significativas entre los resultados obtenidos aplicando diferente energía de dispersión, por lo que se seleccionó 2000 J como la energía de re-dispersión óptima. En la tabla 7, se muestra un resumen de las condiciones seleccionadas para la preparación de electrodos de MWCNTs para su posterior estudio en el análisis de polifenoles.

Tabla 7. Condiciones óptimas para la preparación de electrodos modificados con dispersiones de MWCNTs.

Condiciones	
Dispersión (PEI-Agua/MWCNTs)	<ul style="list-style-type: none"> Concentración de MWCNTs $\rightarrow 0.50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Concentración de PEI $\rightarrow 0.25\%$ (m/m) Energía de dispersión en PEI $\rightarrow 2000 \text{ J}$

Electrodo [GCE(PEI- Agua/MWCNTs)]	<ul style="list-style-type: none">• Condiciones de centrifugación → 2500 rpm, 20 min.• Energía de redispersión en agua → 2000 J
	<ul style="list-style-type: none">• Depositar 5 μL de dispersión sobre GCE• Proceso de evaporación de las dispersiones por 12 horas

Estudios de la respuesta voltamperométrica de polifenoles en el electrodo desarrollado.

Una vez desarrollado el electrodo se procedió a estudiar su respuesta electroquímica hacia otros polifenoles (ácido cafeico, ferúlico y *p*-cumárico, así como la catequina). que se encuentran presentes en el vino. Se prepararon los electrodos de acuerdo con el procedimiento optimizado. A continuación, se registraron los voltamperogramas de barrido cíclico de cada uno de los polifenoles en concentración $1.00 \times 10^{-4} \text{ M}$ a una velocidad de barrido de $0.050 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ en el GCE y en el electrodo desarrollado [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)].

En la figura 10, se presentaron las respuestas obtenidas para diferentes polifenoles, en las dos superficies de electrodos. Además, en la tabla 8, se mostraron los valores medios de los potenciales e intensidades de pico correspondientes a la primera señal de oxidación de todos los analitos, con la desviación estándar obtenida con tres superficies de electrodo diferente por triplicado, así como la intensidad de corriente capacitativa y la relación I/C tanto para el electrodo de GCE modificado con MWCNTs y GCE sin modificar.

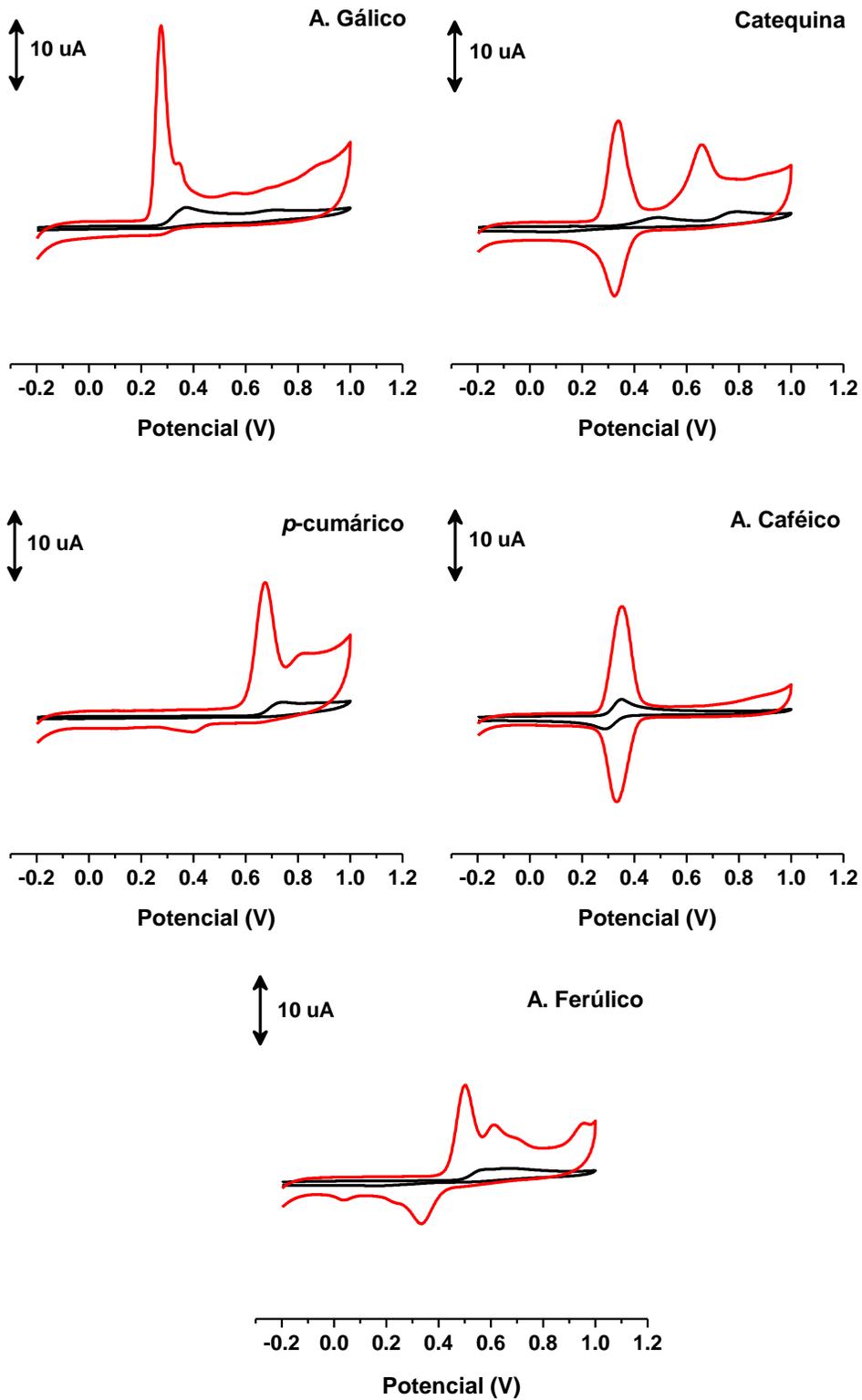


Figura 10. Señales voltamperométricas cíclicas de diferentes polifenoles: ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico y ácido ferúlico, así como la catequina a concentración 1.00×10^{-4} M y $0.050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. GCE (*Negro*) y [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)] (*Rojo*).

Tabla 8. Resultados de voltamperogramas de barrido cíclicos en polifenoles a 1.0×10^{-4} M y $0.050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ en GCE y [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)].

Polifenoles	Electrodos	Potencial E [mV]	Intensidad I [μ A]	Corriente	
				capacitativa C [μ A]	I/C
Ácido Gálico	GCE	0.38±0.01	2.6±0.1	0.3±0.2	17±11
	GCE(PEI-Agua/MWCNTs)	0.279±0.002	33±4	1.2±0.3	28±4
Catequina	GCE	0.47±0.03	1.2±0.1	0.2±0.1	9±3
	GCE(PEI-Agua/MWCNTs)	0.339±0.001	15±1	0.9±0.2	17±3
Acido <i>p</i> -cumárico	GCE	0.72±0.02	1.9±0.1	0.16±0.05	12±4
	GCE(PEI-Agua/MWCNTs)	0.674±0.001	18±1	1.2±0.1	16±3
Ácido cafeico	GCE	0.36±0.1	2.3±0.2	0.5±0.4	8.2±8.4
	GCE(PEI-Agua/MWCNTs)	0.351±0.001	16±1	0.8±0.1	21±4
Ácido ferúlico	GCE	0.663±0.001	1.7±0.1	0.20±0.02	8±1
	GCE(PEI-Agua/MWCNTs)	0.500±0.002	16±2	1.1±0.3	15±3

Los resultados son la media (n=3) ± desviación estándar

Los resultados mostraron que cuando se emplean electrodos modificados con MWCNTs se observa mayores intensidades tanto en los picos anódicos como catódicos, en todos los polifenoles estudiados, en comparación con los obtenidos con el GCE sin modificar. Además, en el caso de los ácidos: gálico ($\Delta E=105 \text{ mV}$), *p*-cumárico ($\Delta E=0.05 \text{ mV}$), cafeico ($\Delta E=0.006 \text{ mV}$), y ferúlico ($\Delta E=163 \text{ mV}$), así como la catequina ($\Delta E=131 \text{ mV}$), existió una disminución en el potencial de

pico correspondiente a la primera señal de oxidación cuando se utiliza el electrodo [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)], esto podría estar relacionado a la presencia de MWCNTs en la superficie de GCE que da lugar a un desplazamiento hacia potenciales de oxidación más favorables.

Finalmente, en todos los casos existió un aumento considerable de las intensidades de pico anódicas cuando se emplea GCE modificado con MWCNTs, produciéndose también un incremento en la corriente capacitativa. A pesar de ello, los valores de la relación I/C son superiores en todos los casos a los obtenidos con GCE sin modificar. El aumento general de las intensidades observadas al utilizar [GCE(PEI-Agua/MWCNTS)] podría explicarse como una consecuencia del aumento del área superficial del GCE una vez formada la capa de material nanoestructurado.

Teniendo en cuenta las respuestas electroquímicas obtenidas, el electrodo [GCE(PEI-Agua/MWCNTS)] podría utilizarse como electrodo de trabajo en un sistema de inyección en flujo (FIA) con detección amperométrica con el fin de obtener índices electroquímicos, definidos por las respuestas de los analitos a diferentes potenciales de detección, lo que permitiría distinguir diferentes grupos polifenólicos de fácil y difícil oxidación, tales como ácidos: gálico y cafeico, así como la catequina los cuales comienzan a oxidarse a potenciales en torno a 250 mV, mientras que los ácidos ferúlico y cumárico, no comienzan a oxidarse hasta potenciales por encima de 450 mV, por lo que se conseguiría realizar una clasificación de vinos en base al contenido total de polifenoles

Tabla 9. Parámetros analíticos de calibración para diferentes compuestos polifenólicos, empleando dos electrodos de trabajo: GCE y [GCE(PEI-Agua/MWCNTs)].

Polifenoles	Potencial E [V]	GCE					GCE(PEI-Agua/MWCNTs)				
		Ordenada [μA]	Pendiente [μA·μmol ⁻¹ ·L]	r	L D [μM]	IL [μM]	Ordenada [μA]	Pendiente [μA·μmol ⁻¹ ·L]	r	L D [μM]	IL [μM]
Ac. Gálico	0.400	0.02±0.03	0.01493±0.00006	0.998	0.33	1.09-75	0.04±0.05	0.0488±0.001	0.990	0.49	1.63-75
	0.600	0.01±0.02	0.03197±0.00004	0.990	0.16	0.52-10	0.02±0.05	0.0505±0.001	0.990	0.39	1.29-75
	0.800	0.0000023±0.049	0.05066±0.00009	0.990	0.10	0.34-10	0.022±0.07	0.0714±0.002	0.991	0.21	0.70-75
Ac. Cafeico	0.400	0.023±0.02	0.01093±0.00004	0.997	0.65	2.17-75	0.036±0.05	0.049±0.001	0.990	0.24	0.81-10
	0.600	0.0083±0.01	0.02266±0.00003	0.990	0.27	0.90-75	0.018±0.04	0.02856±0.00007	0.998	0.34	1.12-10
	0.800	0.046±0.03	0.02602±0.00005	0.990	0.23	0.73-75	0.017±0.03	0.02799±0.00005	0.990	0.63	2.10-75

					10							10
					0							0
												2.4
	0.400	0.004±0.007	0.005±0.0005	0.995	0.206	0.88-25	0.007±0.009	0.01805±0.00002	0.990	0.704	6-10	6-10
Catequina	0.600	0.021±0.001	0.01642±0.00002	0.990	0.006	9-10	0.013±0.02	0.01919±0.00003	0.990	0.803	6-10	6-10
	0.800	0.004±0.001	0.0049±0.00005	0.995	0.401	1.36-25	0.098±0.06	0.037±0.001	0.997	0.505	1.82-75	1.82-75
Ac. Ferúlico	0.600	0.008±0.001	0.01851±0.00009	0.998	0.101	0.35-25	0.041±0.05	0.031±0.002	0.997	0.406	1.55-50	1.55-50
	0.800	0.013±0.002	0.0184±0.001	0.996	0.101	0.36-25	0.024±0.02	0.03163±0.00009	0.990	0.403	1.44-50	1.44-50
Ac. Cumárico	0.800	0.042±0.008	0.0201±0.0005	0.972	0.100	0.33-25	0.0719±0.06	0.039±0.002	0.997	0.300	1.00-50	1.00-50

Los resultados son la media (n=3) ± desviación estándar

En base a lo mostrado, es importante mencionar que existe un aumento progresivo de la señal de picos al aumentar la concentración del polifenol, en el electrodo GCE modificado con MWCNTs, cosa que rápidamente se deja de observar en el GCE a potenciales mayores de 0.600 V, especialmente al medir ácido ferúlico y *p*-cumárico. Por otra parte, la respuesta lineal en todos los casos es más extensa al emplear el GCE modificado con los MWCNTs.

Así mismo, estos resultados muestran que los valores de ordenada en el origen obtenidos de la ecuación de la recta, son cercanos a cero, para ambos electrodos, mientras que las pendientes son relativamente mayores aumentando la sensibilidad del método al emplear GCE modificado con MWCNTs en comparación al electrodo GCE sin modificar. Por último, los límites de detección (LD) son similares porque hay un aumento en la corriente capacitativa de los MWCNTs que compensa el aumento en la sensibilidad.

1. CONCLUSIONES

2. Se optimizó el procedimiento de elaboración de dispersiones de nanotubos de carbono multicapa, para ello las condiciones idóneas fueron: 0.50 mg·mL⁻¹ de concentración del nanomaterial, 0.25% (m/m) de PEI, 2000 J de energía de dispersión en PEI, centrifugación (2500 rpm; 20 min) y redispersión en agua aplicando energía de 2000 J.
3. Se obtuvieron electrodos modificados con dispersiones de MWCNTs, obteniéndose superficies más homogéneas que proporcionan mejores resultados voltamperométricos para los ácidos: gálico, cafeico, ferúlico y p-cumárico, así como la catequina.
4. El método electroquímico, proporciona mayor estabilidad, reproducibilidad, sensibilidad, selectividad de polifenoles y rapidez de análisis, generando una alternativa a los estudios espectrofotométricos.

Referencias

- Blasco, A. J., González Crevillén, A., González, M. C., & Escarpa, A. (2007). Direct electrochemical sensing and detection of natural antioxidants and antioxidant capacity in vitro systems. *Electroanalysis*, 19, 2275–2286.
- Cifuentes, A. (2006). Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis. *Electrophoresis*, 27, 283–303.
- Hernández, A., & Prieto, E., (1999). Plantas que contienen polifenoles. *Revista Cubana Investigación Biomédica*; 18(1):12-4.
- Hurtado-Fernández, E., Gómez-Romero, M., Carrasco-Pancorbo, A., & Fernández- Gutiérrez, A. (2010). Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53, 1130–1160.

- Jackson, R., (2008). Wine science: Principles and applications, 3rd edition, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands 2008, Chapter 6, pp. 270–331.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E. & Hilpert, K. F., (2002). Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*, 113, 71S–88S.
- Sánchez-Arribas A, Martínez-Fernández M, Moreno M, Bermejo E, Zapardiel A, & Chicharro M. (2013). Analysis of total polyphenols in wines by FIA with highly stable amperometric detection using carbon nanotube modified electrodes. *Food Chemistry*; 136: 1183-1192
- Sánchez-Arribas A., Martínez-Fernández M., & Chicharro M., (2012). The role of electroanalytical techniques in analysis of polyphenols in wine. *Trends in Analytical Chemistry*. 34: 78-96.
- Singleton V., Orthofer R., & Lamuela R., (1974). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299 (14): 152-177.
- Soleas, G., Diamandis, E., & Goldberg, DM., (1997). Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *Journal Clinical Laboratory. Analysis.*; 11(5):287-313.
- Wang Q., Han Y., Wang Y., Qin Y., & Guo Z. (2008); Effect of surfactant structure on the stability of carbon nanotubes in Aqueous solution. *Journal Physical Chemical*. 112, 7227-7233.