



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
Dept. de Química Analítica
i Química Orgànica

David Munuera Sánchez

EVALUCACIÓN DE UNA NUEVA ESTRATEGIA DE CALIBRACIÓN TEMPORIZADA PARA LA DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Trabajo de fin de grado



Nanosensors Group

Supervisado por,

Prof. Pascal Blondeau y Prof. Francisco J. Andrade

Tarragona, 15 de junio 2025

Agradezco la buena acogida y oportunidad de haber podido trabajar en el grupo de investigación, los conocimientos que me han transmitido y los buenos momentos vividos dentro y fuera del laboratorio.

También agradezco a mis padres por todo el apoyo que me han dado todos estos años y que me hayan dado la oportunidad de poder abrir mis propias puertas.

INDICE

1. RESUMEN	5
2. OBJETIVOS	6
3. INTRODUCCIÓN	7
3.1. Sensores y técnicas electroquímicas	7
3.2. Peróxido de hidrógeno	9
3.3. Platino	10
3.4. Celdas electroquímicas semiabiertas	12
3.5. Modos operacionales.....	15
3.6. Fundamentos	16
4. PARTE EXPERIMENTAL	17
4.1. Disoluciones, reactivos y materiales	18
4.2. Elaboración de sensores CESA	19
4.3. Experimentos	21
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
5.1. Calibración estándar en OCP	24
5.2. Análisis de la respuesta CESA por la modulación del tiempo a distintas concentraciones	27
5.3. Calibración con método de cortocircuito	34
6. CONCLUSIONES.....	40
7. BIBLIOGRAFÍA	42
8. ANEXOS.....	44
8.1 Anexo 1	44
8.2 Anexo 2	47

1. RESUMEN

English

This work presents the development and evaluation of a novel methodology to control the analytical response of semi-open potentiometric electrochemical sensors, through modulation of open-circuit potential (OCP) time. The proposed method, based on electronically controlled short-circuits (MCC), allows investigation of how charge accumulation varies with time and analyte concentration (H_2O_2). Results show that at low concentrations, longer accumulation times are needed to obtain significant responses, while at high concentrations, the sensor response stabilizes more quickly. An OCP time of 150 seconds was optimized as suitable across the working range. Although the MCC method demonstrated lower sensitivity than the standard method, its ability to modulate the sensor response makes it a promising alternative due to the ability to adapt the sensor's response to a wide range of concentrations, increasing its functional versatility. Furthermore, it provides greater operational robustness, baseline standardization, and promotes faster system stabilization.

Castellano

Este trabajo de fin de grado presenta el desarrollo y evaluación de una metodología novedosa para controlar la respuesta analítica de sensores electroquímicos potenciométricos semiabiertos, mediante la modulación del tiempo de circuito abierto (OCP). Se propone un método basado en cortocircuitos controlados electrónicamente (MCC), que permite estudiar cómo la acumulación de carga varía según el tiempo y la concentración del analito (H_2O_2). Los resultados muestran que a bajas concentraciones es necesario un mayor tiempo de acumulación para obtener respuestas significativas, mientras que a concentraciones altas la respuesta se estabiliza más rápidamente. Se optimizó un tiempo de 150 segundos de OCP como adecuado para todo el rango de trabajo. Aunque el método MCC mostró menor sensibilidad que el estándar, su capacidad para modular la respuesta lo convierte en una alternativa prometedora debido a la posibilidad de adaptar la respuesta del sensor a un amplio intervalo de concentraciones aumentando su versatilidad funcional. Además, proporciona una mayor robustez operativa, una estandarización de la línea base y favorece una estabilización más rápida del sistema.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es evaluar una nueva metodología analítica para un sensor electroquímico a través de un método basado en la modulación del tiempo de acumulación de potencial en la superficie del electrodo.

Para conseguir este objetivo se proponen los siguientes objetivos secundarios:

- Evaluar la respuesta del sensor con un método de referencia actualmente utilizado en el grupo de investigación.
- Optimizar el tiempo de activación del circuito evaluando el efecto en la acumulación de potencial.
- Estudiar el efecto del tiempo de acumulación establecido en condiciones de concentración creciente de analito.
- Evaluar el rendimiento del sensor aplicando la metodología de estudio en un marco amplio de concentración de analito.

3. INTRODUCCIÓN

El trabajo se ha desarrollado en el departamento de Química Analítica y Química Orgánica de la Facultad de Química en la Universidad Rovira i Virgili, concretamente en el grupo de investigación de quimiometría y nanosensores, *Chemosense*.

Chemosense es un grupo que permite la convergencia entre nuevas tecnologías de sensores químicos, instrumentación/métodos analíticos rápidos y respetuosos con el medio ambiente. El grupo de Nanosensores se dedica al desarrollo de sensores bioquímicos para el monitoreo de glucosa y lactato. Estos se centran en monitorear biomarcadores de manera no invasiva, por ejemplo, a partir del sudor, revolucionando los sensores electroquímicos vistos hasta el momento.

3.1. Sensores y técnicas electroquímicas

El uso de sensores ha tenido un gran impacto en la vida cotidiana de la humanidad debido a las funciones que ejercen, como el monitoreo y detección de cambios que se producen en un entorno. Se han utilizado para la recopilación, almacenaje y análisis de datos de forma remota con fines de seguridad, sobre todo aquellos cuya obtención pueda suponer un riesgo. Con la triplicación del uso de estos en las últimas dos décadas se han dirigido más a aplicaciones relacionados con sistemas de detección. Las aplicaciones variables que ofrecen los sensores han hecho que su implementación se haya extendido en casi todos los sectores, como el industrial, ambiental y sanitario viéndose aplicados para la detección de gases, monitorización ambiental y monitorización de parámetros fisiológicos entre otros.¹

Con las crecientes necesidades de la sociedad y la aparición de sensores de monitoreo constante, la comercialización y utilización de estos aumentaron considerablemente debido a su amplia aplicabilidad. Esto ha facilitado y favorecido sistemas de generación de información descentralizados haciendo que la calidad de vida humana mejore notablemente al brindar la posibilidad de obtener soluciones ante un problema de forma más rápida.¹

Los sensores son todos aquellos dispositivos los cuales, a partir de un estímulo físico o químico en su entorno, responden a estos mismos dando una señal de interés analítico.² En lo que concierne al trabajo, este se centra concretamente en los electroquímicos, donde el estímulo del entorno es de naturaleza química. La señal proporcionada por este vendrá de la interacción química entre analito y electrodo permitiendo determinar la concentración de una especie química o analito en particular.²

Todo sensor electroquímico contiene dos partes esenciales que permite su funcionamiento: el receptor y el transductor.

El receptor es la parte del sensor que interactúa químicamente con la especie química en cuestión, donde este puede tener una especificidad concreta hacia ella, dando como fruto de cuya interacción una respuesta eléctrica. Complementariamente, el transductor es aquella parte que se encarga de captar y transformar esta respuesta eléctrica en una señal cuantificable, dando un valor analítico³ tal como se muestra en la Figura 1.

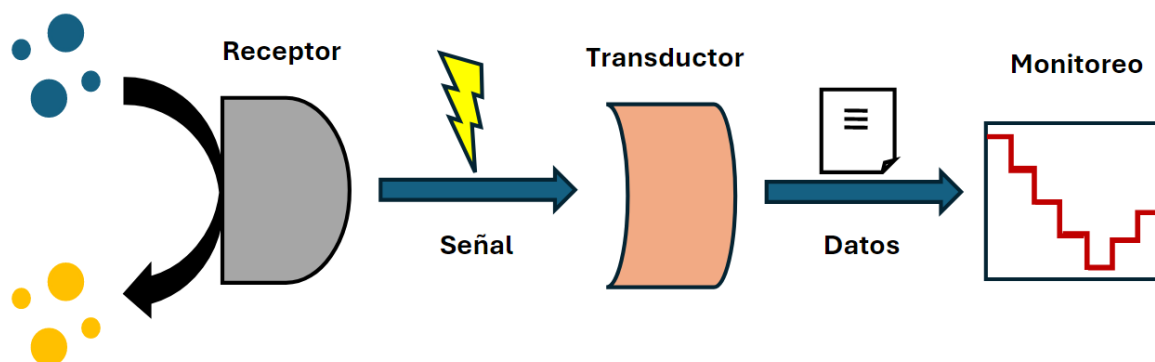


Figura 1. Esquema del funcionamiento de un sensor electroquímico.

Los sensores electroquímicos pueden clasificarse de muchas maneras dependiendo de la técnica electroquímica y la variable eléctrica que miden. Cuando se trata de una potenciometría el dispositivo se clasifica como un sensor electroquímico potenciométrico donde la variable eléctrica que mide es potencial (EMF). Si la técnica se trata de una amperometría se considera un sensor electroquímico amperométrico donde la variable eléctrica que registra es la corriente (I). En el caso de tratarse de una Columbimetría este es un sensor electroquímico columbimétrico donde la variable eléctrica corresponde a la carga eléctrica (C)...^{2,3}

Las técnicas principales más utilizadas son:

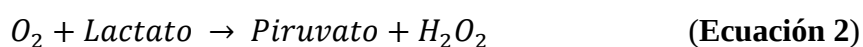
Amperometría: Es una técnica que consiste en la medición del corriente resultante en aplicar una diferencia de potencial en un circuito ($EMF \neq 0$). La técnica requiere tres electrodos diferentes, el electrodo de trabajo o indicador, electrodo de referencia y el electrodo auxiliar (evita que la corriente circule por el electrodo de referencia pudiendo afectar el potencial que se mide con respecto al electrodo de trabajo).²

Potenciometría: Es una técnica que consiste en la medición de la diferencia de potencial con nulo paso de corriente que se crea entre dos electrodos de manera espontánea en una celda siguiendo un proceso Nernstiano. Esta técnica requiere dos electrodos diferentes, el electrodo de trabajo o indicador (experimenta la interacción espontánea con la especie química) y el electrodo de referencia (electrodo de potencial constante) conectados a un equipo de alta impedancia.²

3.2. Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una especie química de gran importancia debido a que actúa como biomarcador, siendo un importante indicador de afecciones en la salud de una persona.⁴

El H_2O_2 también se produce como subproducto durante muchos procesos catalizados por enzimas oxidasas.⁵ Estas enzimas son biocatalizadores que en frente de biomoléculas como glucosa o lactato se activan para acelerar las reacciones en las que se encuentran estas involucradas, donde son de naturaleza oxidativa, obteniéndose productos oxidados uno de los cuales es generalmente el H_2O_2 (Ecuación 1,2)^{6,7}. Esta situación hace que esta molécula tenga un alto valor en el sector analítico en la detección indirecta de biomarcadores.⁸



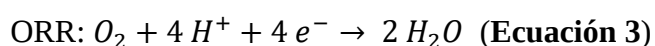
3.3. Platino

Los sensores electroquímicos, como se ha comentado anteriormente, interaccionan con un analito para dar una señal eléctrica cuantificable. La interacción se da entre la especie química activa y el electrodo del sensor, donde esta interacción vendrá dada por la naturaleza química de ambas partes, tanto analito como del electrodo.

El platino (Pt) es un metal que presenta una afinidad química a especies oxigenadas como O_2 , H_2O y H_2O_2 . Al encontrarse en un entorno con unas especies par redox no bien definidas experimenta una serie de procesos complejos en su superficie debido a que no hay un equilibrio entre estos (condiciones no Nernstiana). Esto viene explicado generalmente por el mecanismo del potencial mixto (PM).⁹

El PM es el potencial resultante que experimenta el Pt en condiciones de potencial de circuito abierto (*open circuit potential*, OCP) debido a la contribución de los distintos procesos que experimenta en su superficie. Cuando estos procesos catódicos y anódicos de especies oxigenadas (O_2 , H_2O_2 , H_2O) se compensan y equilibran entonces hablamos de que se encuentran en un estado estacionario⁹ presentando un potencial estable.

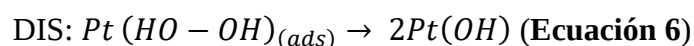
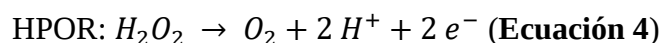
La reacción química que más determina el potencial mixto del Pt es la reacción de reducción del oxígeno (*oxygen reduction reaction*, ORR) (Ecuación 3)⁹.



Esta reacción es un proceso catódico ya que consiste en la reducción del oxígeno disuelto en el medio. Esta forma parte de un proceso complejo afectado por diversos factores relacionados con la composición de la solución y el estado superficial del Pt.⁹ Al ser una reacción catódica, la ORR es un proceso de secuestro de electrones, por lo tanto, cualquier disminución en la actividad de la ORR conduce a una menor tasa de captación de electrones, lo que lleva a un estado estacionario con un potencial en el Pt más negativo.⁹ De este modo se puede perturbar el proceso añadiendo una especie oxigenada como el peróxido de hidrogeno, forzando a llegar a un nuevo estado estacionario que se desplaza a potenciales más negativos, donde utilizando esta obstaculización del proceso principal se obtiene una señal de utilidad analítica.

A medida que se aumenta H_2O_2 en el sistema, el Pt experimenta más reacciones químicas en su superficie que son las que perturbarán a la ORR y desplazarán el equilibrio del sistema a uno nuevo.

Son tres procesos los que obstaculizan a la ORR. El primero es la reacción de oxidación del peróxido de hidrógeno (*hydrogen peroxide oxidation reaction*, HPOR), de naturaleza anódica (Ecuación 4) y catalizada por óxido de platino (PtO). El segundo es la adsorción del H_2O_2 (Ecuación 5) y el tercero su disociación (Ecuación 6).¹⁰



Dependiendo de la concentración de H_2O_2 que se encuentre en el sistema se pueden crear tres situaciones características en el comportamiento de los procesos sobre el Pt:

- Situación 1: Se da cuando la $[H_2O_2]$ es mucho más baja que la $[O_2]$ en solución siendo este inferior de 1 μM . La $[H_2O_2]$ es tan baja que los lugares libres de platino (Pt^*), donde se adsorbe el O_2 para su reducción, no se ven ocupados de manera competitiva. El peróxido de hidrogeno se adsorbe en la superficie del platino que se encuentra en forma oxidada (PtO) donde experimenta su oxidación (HPOR). La concentración al ser tan baja, la señal viene controlada por efectos difusivos ya que el H_2O_2 tiene que llegar a la superficie del metal. Por eso, se establece un régimen de Cottrell, obteniéndose una respuesta lineal a la concentración.¹⁰
- Situación 2: Se produce cuando la $[H_2O_2]$ es comparable a la $[O_2]$ en solución encontrándose este entre 0,01–1 mM. La concentración del H_2O_2 al ser mayor experimenta nuevos procesos como su adsorción y disociación en la superficie del Pt. Este hecho hace que el oxígeno tenga que competir por los Pt^* . Además, el H_2O_2 que se adsorbe, se disocia formando complejos $Pt(OH)$ donde estos mismos actúan como lugares libres para la HPOR, como sucede con el PtO. De este modo, el aumento de la

[H₂O₂] hace que el proceso anódico, HPOR, se vea incrementado exponencialmente, obstaculizando la ORR significativamente y desplazando el estado estacionario a potenciales sobre el metal más bajos debido a la elevada donación de electrones⁹. Esta es una situación que viene dada por un régimen de Tafel, siendo la respuesta exponencial lineal en forma logarítmica.¹⁰

- **Situación 3:** Se encuentra cuando la [H₂O₂] es mucho más grande que la [O₂] en solución hallándose este en concentraciones por encima de 1 mM.¹⁰ En concentraciones tan elevadas el recubrimiento de la superficie del platino es prácticamente en forma de Pt(OH). Esto hace que el O₂ apenas pueda adsorberse sobre la superficie del platino, que junto a que el O₂ comienza a acomplejarse con la especie Pt(OH) formando Pt(OH)·O₂, se inhibe prácticamente la reacción ORR. Por lo tanto, el PM viene expresado por los procesos predominantes de la HPOR y adsorción del H₂O₂. Esta situación es muy compleja y todavía no se conoce plenamente su naturaleza, donde este no sigue ningún tipo de linealidad con la respuesta del metal y conociéndose como régimen de saturación.¹⁰

De esta manera, mediante la perturbación del PM inducido por una especie oxigenada como el H₂O₂ se permite el aprovechamiento del comportamiento del platino para obtener una información analítica. Esto permite la creación de un dispositivo analítico mediante la obstrucción controlada de la ORR donde permite obtener una señal electroquímica útil, ya que el cambio en el PM refleja la presencia y concentración de esta especie.

3.4. Celdas electroquímicas semiabiertas

Conociendo el comportamiento del Pt hacia el H₂O₂ puede construirse un dispositivo que permita la obtención de información analítica donde este vendrá clasificado como un sensor electroquímico potenciométrico.

Los sensores electroquímicos son actualmente una de las áreas de mayor crecimiento y el número de aplicaciones ha crecido exponencialmente en los últimos 20 años.² A su vez, hay un gran interés en el desarrollo de sensores potenciométricos ya que, debido a su combinación de robustez, simplicidad de operación y coste difícilmente puede ser igualada por ninguna otra técnica.¹¹

Es esta la razón por la que la técnica electroquímica utilizada en este trabajo ha sido la potenciométrica. Los sensores electroquímicos potenciométricos ofrecen ventajas como un amplio rango de concentración lineal, facilidad de preparación y uso, bajo coste, corto tiempo de respuesta, buena reproducibilidad, entre otros, donde sumado con la necesidad urgente de crear dispositivos de detección portátiles y económicos se hayan desarrollado sensores a base de papel.¹²

El desarrollo de sensores portátiles ha llevado a la miniaturización de la celda electroquímica tradicional conformada por los electrodos y puente salino en donde se han buscado la óptima organización de cada parte emulando el diseño y el funcionamiento de un píxel de un sistema espectroscópico. El píxel en estos sistemas es el elemento de detección mínima donde se han miniaturizado y creado con una estructura de apilado vertical, donde la capa superior contiene el material sensible y los demás componentes se integran en las capas subyacentes.¹³

De esta idea surgen los pixeles electroquímicos CESA. Los CESA son celdas electroquímicas semiabiertas en donde sus diferentes estructuras se encuentran con una configuración vertical de apilamiento por capas.

Las capas que conforman el CESA se pueden clasificar por un electrodo de trabajo superior macroporoso (*working electrode*, WE), un polielectrolito y un conductor metálico inferior que actúa como un electrodo de referencia interno (*reference electrode*, RE)¹³ donde se aprecia en la Figura 2 A. La estructura del sensor adquiere la forma de una tira de papel tal como se aprecia en la Figura 2 B.

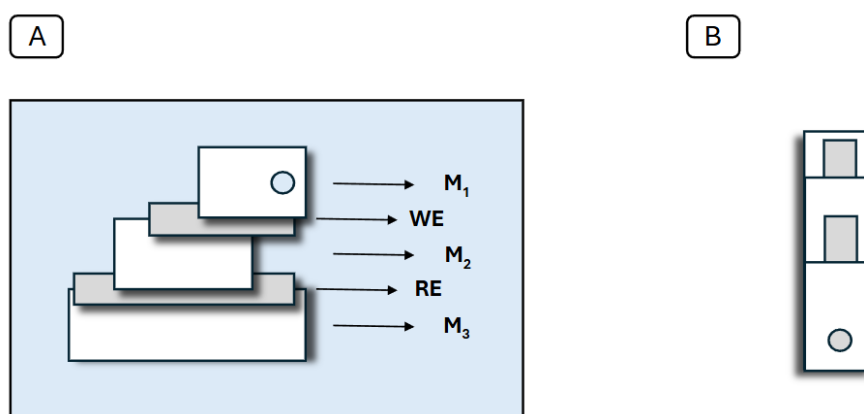


Figura 2. La figura A muestra el esquema general del apilamiento de las diferentes capas del CESA donde M₁, M₂ y M₃ son papel de cara adhesiva, WE, el electrodo de trabajo y RE el de referencia. La figura B muestra el aspecto del sensor.

El polielectrolito (polímero con grupos iónicos) utilizado en el sensor es el Nafion[®], un polímero sulfonato de tetrafluoretileno con carga negativa donde su estructura viene representada en la Figura 3.¹⁴

Este realiza varias funciones dentro del sensor. El Nafion[®] que se pone entre el WE y RE actúa conectando ambos electrodos de manera iónica a su vez que los separa eléctricamente. Este también se adiciona en la zona activa del sensor ya que proporciona una mejora en la respuesta (sensibilidad) debido a que favorece los procesos electroquímicos ya comentados que se producen en la superficie del Pt debido a sus características:

- Actúa como membrana permeable de iones debido a la formación de nano canales con los grupos sulfonato permitiendo el paso selectivo de iones con carga positiva.
- La naturaleza ácida de los grupos sulfonato modifica el pH local permitiendo el intercambio iónico en la membrana.
- La solubilidad del oxígeno en Nafion[®] es mucho mayor que en agua, actuando como reserva.

Debido a todas estas propiedades, el Nafion[®] es un buen potenciador de los procesos electroquímicos que tienen lugar sobre el electrodo de platino, transformando la respuesta errática, baja e inespecífica en una estable y más selectiva al H₂O₂.⁹

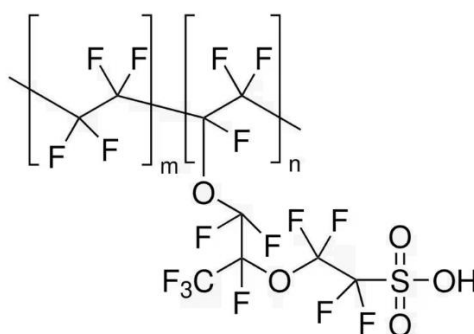


Figura 3. Estructura química del Nafion[®].

El sensor debido a su estructura de apilamiento actúa como un pseudo-capacitor asimétrico.¹⁰ Un capacitor o condensador es un componente electrónico que tiene como función almacenar carga. Este consta de dos placas de un metal conductor, conectados entre sí, con un material

dieléctrico o una separación entre ambos, creándose una acumulación de cargas eléctricas en una e igualándose la carga eléctrica de signo contrario en la otra, dando como resultado la creación de una diferencia de potencial entre las placas.¹⁵ Lo mismo sucede en el sensor. El dispositivo está conformado por dos superficies metálicas, separadas por un polielectrolito donde únicamente queda expuesto al entorno el electrodo de trabajo donde a su vez este se encuentra en contacto iónico con el electrodo de referencia.¹⁰ De este modo el sensor se comporta como un pseudo-capacitor asimétrico donde su carga y descarga da una señal eléctrica que se traduce en una respuesta.

3.5. Modos operacionales

La configuración espacial de los componentes del sensor CESA (dos electrodos con un polielectrolito entre ambos) confiere al sensor el funcionar en dos modos operacionales distintos.

El primero llamado “**modo de corriente**” consiste en la medición de la corriente del circuito cerrado creada por el electrodo de trabajo en adicionar H_2O_2 en la solución (técnica amperométrica).

El segundo llamado “**modo de cortocircuito**” consiste en la medición del re-equilibramiento del potencial de los electrodos momento después de cortocircuitar el sistema en condiciones de OCP. El electrodo de trabajo del sensor se expone a la descomposición/oxidación del H_2O_2 este experimenta una acumulación de carga en su superficie que junto con el electrodo de referencia inferior forman un pseudo-condensador asimétrico. Analíticamente, este modo operacional, mejora la cantidad de información que se puede extraer del sistema haciendo que por su perfil reproducible dependiente del tiempo durante los procesos de carga y descarga pueda aprovecharse para optimizar el sensor.¹⁰ De este modo operacional surge el objetivo de optimizar el tiempo de OCP para el control de la respuesta del sensor donde este será el de uso durante el trabajo.

3.6. Fundamentos

Mediante la realización de una calibración, utilizando estándares de la especie química de interés, se puede determinar el rango lineal en el cual el sensor puede cuantificar un analito en una muestra de concentración desconocida. Esto es debido a que una calibración es la construcción de una relación entre la señal analítica instrumental con la concentración de un analito. Mediante los estándares se crea la función de calibración que permite posteriormente, a través de la relación experimental formulada, determinar la concentración de una muestra real.¹⁶

Los sensores electroquímicos presentan limitaciones a la hora de poder darnos una respuesta en un ambiente químico. Estas vendrán dadas por factores como el tipo de reacción que gobierne en el sistema electroquímico, la concentración de analito que se encuentre, el tiempo de interacción y la cinética de los propios procesos en cuestión.¹⁷

Para intentar paliar este hecho se busca implementar una metodología de mejora en la obtención de información química con el sensor.

El factor concreto en que se centra este estudio es el tiempo que se deja al sensor almacenar señal química. Este hecho se puede asemejar en como un píxel de un dispositivo de carga acoplada (*Charge-coupled device*, CCD) de una cámara digital, transforma un estímulo físico, los fotones, en una señal eléctrica que es traducida a una imagen (Figura 4).

El sensor CCD es una matriz de celdas fotosensibles (píxeles) donde cada una acumula carga eléctrica en función de la cantidad de fotones que incidan sobre ellas.¹⁸ La carga acumulada se transfiere secuencialmente para convertirse en una señal eléctrica. La cuestión está en el tiempo que se deja a los píxeles acumular carga. La cantidad de luz que se encuentre en el medio condicionará el tiempo de apertura de la lente de la cámara digital.

Si en el medio hay una gran cantidad de luz, la lente de la cámara se mantendrá abierta un tiempo corto, ya que debido a la cantidad de fotones que interaccionarán con los píxeles será suficiente para la creación de una buena señal, transformándose en una imagen. En cambio, si se encuentra poca cantidad de luz ambiental (carente de fotones), la lente de la cámara permanecerá más tiempo abierta para que los píxeles obtengan una mayor captación de fotones y así poder generar la acumulación de carga necesaria que dará como resultado la imagen.¹⁹

Esto es lo que se pretende estudiar con el sensor electroquímico. Estudiar el tiempo necesario que hay que dejar al sensor captar información química en un entorno concreto de concentración de analito, para obtener una buena respuesta. Del mismo modo, se pretende observar si modulando el tiempo en OCP, permite controlar la sensibilidad del sensor.

El estudio de la sensibilidad genera un gran interés, ya que es la habilidad que tiene el sensor para distinguir con precisión y exactitud pequeñas diferencias en la concentración de un analito², donde si se consigue modularla a conveniencia, puede ser de gran utilidad debido a la fiabilidad de determinar analitos en un amplio rango de concentraciones.

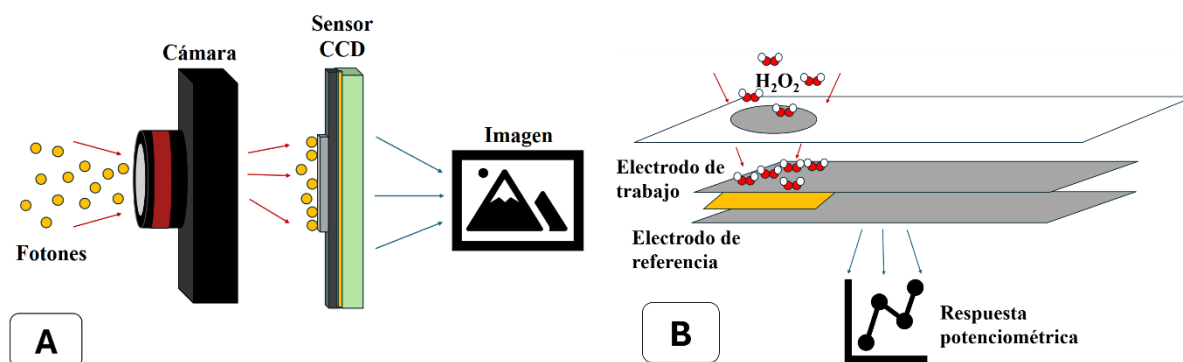


Figura 4. A) Esquema representativo del proceso de obtención de una fotografía. B) Esquema representativo del proceso de obtención de datos analíticos.

4. PARTE EXPERIMENTAL

Los reactivos utilizados en todos los experimentos realizados durante el trabajo se encuentran en el Anexo 1, apartado 8.1. Este especifica las características de toxicidad y manipulación de estos mismos.

Las condiciones experimentales de cada experimento fueron diferentes donde variaron según la metodología utilizada entre la estándar (calibración utilizada en el grupo de investigación) y la nueva en estudio (calibración con método de cortocircuito). En cada ensayo que se realizó, se utilizó celdas de un volumen conocido de PBS en las cuales se realizaron adiciones de estándares de H_2O_2 a diferentes concentraciones expresadas en magnitud logarítmica

($\text{Log} [\text{H}_2\text{O}_2, \text{M}]$), donde para una concentración de 0.01 M = -2. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (25°C) con agitación constante de la solución en la celda. Las medidas potenciométricas fueron realizadas por dos equipos diferentes, el EMF16 multicanal (Lawson Laboratories, Inc. Malvern) y el DMM6500 6 ½ -Digit Bench/System Digital Multimeter (Keithley, Tektronix Company). Cada análisis se realizó por un número de entre 2-3 réplicas, utilizándose cada sensor independientemente para el estudio posterior de la repetibilidad y reproducibilidad.

4.1. Disoluciones, reactivos y materiales

Para la realización de la solución tampón fosfatada 0.1 M (*phosfat buffer solution*, PBS) pH = 7.4 se utilizaron las siguientes sales: cloruro de potasio 0.003 M (KCl) $\geq 99,0\%$, cloruro de sodio 0.1 M (NaCl) $\geq 99,0\%$, fosfato de potasio monobásico 0.02 M (KH_2PO_4) $\geq 99\%$ y fosfato de sodio dibásico 0.1 M (Na_2HPO_4) $\geq 99,0\%$. Estas se disolvieron en agua Milli-Q® (agua doblemente desionizada).

Los estándares de H_2O_2 se realizaron a partir de una solución concentrada del 30% (w/w) en agua. Estos se realizaban diariamente antes de su utilización y se guardaban en la nevera entre calibraciones para evitar su posible degradación.

Los sensores CESA fueron elaborados con papel de cara adhesiva (AR Care 8259, Adhesives Research, Inc., PA, USA), papel de filtro de calidad Whatman® de grado 1 recubierto por una capa de platino (Pt) de 100 nm mediante la técnica de deposición por sputtering y pegamento instantáneo.

Para el puente iónico y el recubrimiento de la zona activa del sensor se utilizó una dispersión de Nafion® D-521, 5% (w/w) en agua y 1-propanol.

Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

El método de cortocircuito (MCC) estaba formado por el montaje de un pequeño sistema electrónico conformado por una placa Arduino (protoboard), cables de puente, módulos de relay-interruptor Songle y una placa Arduino Nano 33 IoT. Todos los componentes electrónicos se adquirieron en Farnell Components SL (Madrid, España).

4.2. Elaboración de sensores CESA

Todos los CESA que se utilizaron en este trabajo se elaboraron previamente a los experimentos de manera manual.

Como material se utilizó papel de cara adhesiva (máscara). Este actuaba como separador y aislante de los electrodos del sensor. También se utilizó papel de filtro recubierto por una capa de Pt de 100 nm, donde este se empleó para realizar los electrodos de trabajo (WE) y de referencia (RE).

Para la elaboración del sensor se recortó 3 tipos de máscaras diferentes. La máscara M_1 tenía las dimensiones de 1 cm de base $\times$ 4 cm de altura, la máscara M_2 1 cm de base $\times$ 1,8 cm de altura y por último la máscara M_3 1 cm de base $\times$ 3,5 cm de altura. A la máscara M_1 se le realizó un agujero de 3 mm un poco por debajo de la mitad de la pieza, dejándose al descubierto una parte del electrodo de trabajo, que actuó como zona activa del sensor. Posteriormente se procedió a recortar 2 tipos de piezas con el papel de filtro recubierto con Pt. La primera pieza, que actuó como electrodo de trabajo (WE), se recortó con las dimensiones de 0,5 cm de base $\times$ 2 cm de altura mientras que la segunda lo hizo como el electrodo de referencia (RE), donde se recortó con 0,5 cm de base $\times$ 2,9 cm de altura quedando como se muestra en la Figura 5 A.

Recortadas las piezas se procedió con el montaje del sensor, empezando por la unión de M_1 con WE, donde este se unió de cara a la parte adhesiva de M_1 , quedando visible el Pt por el agujero de 3 mm por la cara reversa de M_1 .

Por la parte trasera del WE, a la altura del agujero de 3 mm, se adicionó 5 μ L de la dispersión de Nafion[®] y se dejó secar 10 minutos (Figura 5 B). Pasado ese tiempo se repitió una vez más el proceso. Aquí el Nafion[®] actuó como puente iónico entre el WE y RE.

Se unió la pieza inicial conformada por M_1 -WE sobre la pieza M_2 -RE- M_3 superponiendo la zona del WE con Nafion[®] sobre la zona de 0,5 cm del RE que quedaba visible como se muestra en la Figura 5 C. Una vez montado el sensor se procedió a sellar los bordes de este con pegamento instantáneo, tapando posibles agujeros (Figura 5 D).

Finalmente se realizó una adición de 5 μ L de la dispersión de Nafion[®] sobre la zona activa donde se dejó secar mínimo 2 horas, acabándose de elaborar el CESA.

En el Anexo 2, apartado 8.2, se encuentra el procedimiento de manera ilustrada para una mayor facilidad en el entendimiento del montaje.

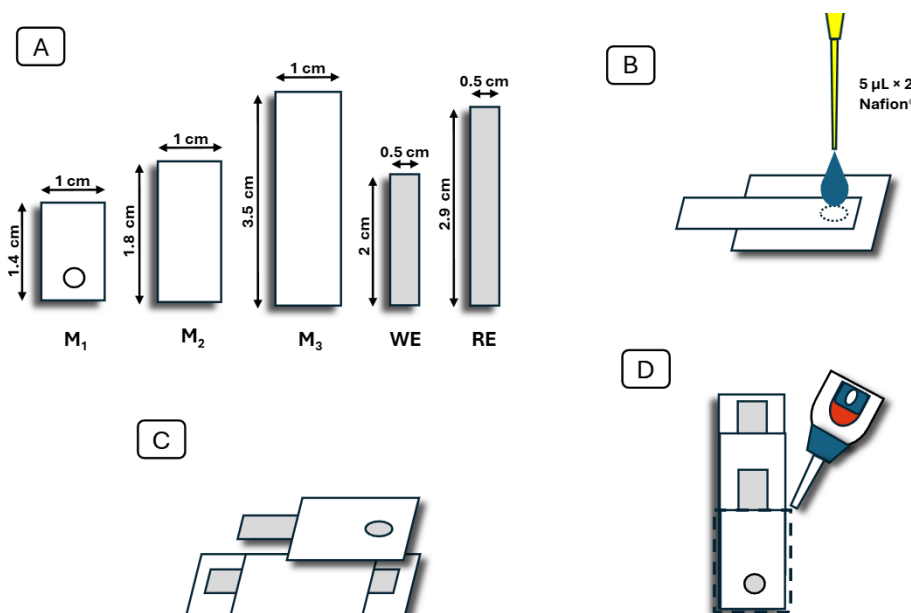


Figura 5. Proceso de elaboración de un sensor CESA. La figura **A** representa las piezas con sus dimensiones, necesarias para el montaje del sensor. La figura **B** muestra cómo se debe adicionar los 5 μ L de Nafion[®] para crear el puente iónico. La figura **C** es la unión de las piezas finales para obtener el sensor. La figura **D** enseña cómo aplicar el pegamento instantáneo de manera adecuada.

4.3. Experimentos

4.3.1. Calibración estándar en OCP

La calibración se realizó por triplicado para cada uno de los tres CESA. Se introdujeron los tres sensores en la misma celda realizándose la calibración de estos al mismo tiempo. Los sensores se dejaron hidratar en la solución tampón de PBS durante la noche anterior a la calibración, para asegurar la correcta hidratación del Nafion[®].

Para la calibración, los sensores se sumergieron en un volumen de PBS (Figura 6). En esta solución se realizaron adiciones consecutivas de los estándares de H₂O₂ cada 100 segundos, los cuales habían sido elaborados previamente. Se realizaron 9 adiciones donde se consiguió una [H₂O₂] en la celda que varió de -6 a -2 con saltos de 0,5.

También se realizó una calibración por triplicado para dos sensores en un rango de concentraciones micro molar (μM). Los sensores al igual que en el experimento previo, se dejaron hidratar en la solución tampón de PBS durante la noche anterior a la calibración, para asegurar la correcta hidratación del Nafion[®].

En la celda de volumen conocido se realizaron 9 adiciones consecutivas cada 100 segundos de los estándares de H₂O₂. Con estas se consiguió una concentración creciente en la celda de -7,5 a -3,5 con saltos de 0,5.

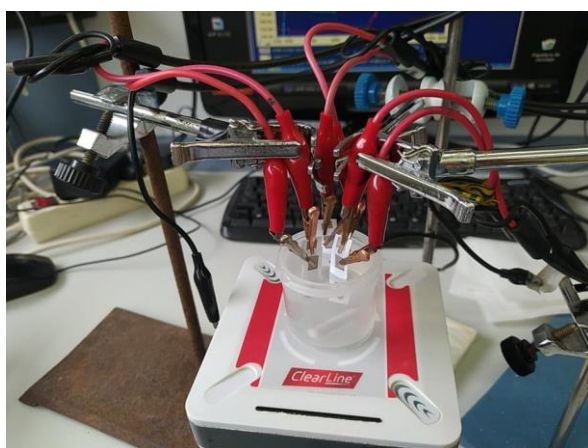


Figura 6. La figura muestra los sensores sumergidos en la celda de PBS.

4.3.2. Optimización del tiempo en OCP para la modulación de la respuesta del CESA a distintas concentraciones

El análisis se realizó para tres CESA independientes. Al equipo potenciométrico se le acopló el circuito electrónico que permitió realizar la metodología de estudio (Figura 7). Todos los sensores se dejaron hidratar en PBS durante la noche anterior al ensayo.

Cada sensor se sumergió en un volumen de PBS, donde se realizó la adición correspondiente de estándar de H_2O_2 para lograr la concentración deseada en la celda y evaluar la respuesta del sensor en diferentes tiempos en OCP, para una misma concentración. Por cada concentración, para cada sensor, se renovó el PBS de la celda para realizar la nueva adición de estándar.

Los tiempos a los que se dejaron los sensores acumular señal para cada concentración, de -6 a -3 con saltos de 1.0, fueron 50, 100, 150 y 200 segundos.

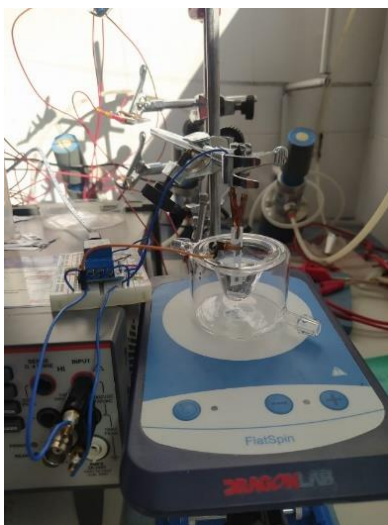


Figura 7. La ilustración muestra el equipo potenciométrico montado junto con la incorporación del circuito electrónico donde el sensor se encuentra sumergido en la celda de PBS.

4.3.3. Calibración con método de cortocircuito

La calibración se realizó por duplicado para 3 sensores. El equipo potenciométrico utilizado se le acopló el circuito electrónico conformado por 3 relay los cuales permitían abrir y cerrar el circuito eléctrico de los 3 sensores simultáneamente. La placa Arduino mediante su programación permitía controlar el funcionamiento de los relay, activándolos en intervalos de tiempos concretos previamente especificados (Figura 8). Cuando la placa Arduino activaba al relay hacia que este cerrase el circuito eléctrico, creando un cortocircuito en el sistema. Cuando el Arduino volvía a activar el interruptor, abría de nuevo el circuito, encontrándose el sistema en condiciones de OCP. Este control del tipo de circuito del sistema, en intervalos determinados de tiempo, permitió la realización de la metodología MCC.

Los sensores se dejaron hidratar en PBS durante la noche anterior a la calibración.

Estos se sumergieron en un volumen de PBS donde se realizaron las adiciones consecutivas de los estándares de H_2O_2 . Por cada adición se dejó un tiempo de acumulación de carga de 150 segundos, donde al obtener 3 acumulaciones estables, se procedió a la siguiente adición. Se realizaron 9 adiciones que llevaron la concentración de H_2O_2 de la celda a valores de -7,5 a -3,5 con saltos de 0,5.

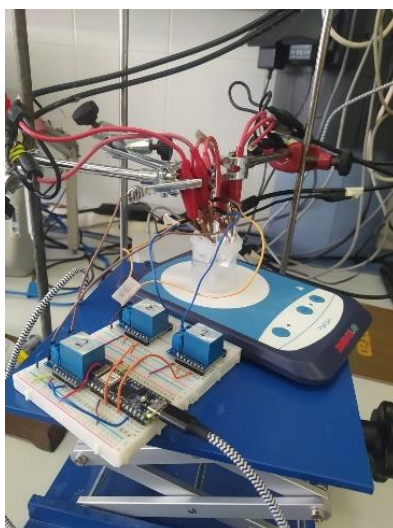


Figura 8. La figura muestra el equipo montado, donde se aprecia el circuito electrónico con 3 relay y los tres sensores sumergidos en la celda de PBS.

También se realizó una calibración por duplicado para cada uno de los 3 sensores, en un rango de concentración más amplio tanto en regiones μM como logarítmicas. El circuito electrónico usado fue el mismo del experimento anterior, pero con la diferencia de la utilización de un único relay, ya que las calibraciones se realizaron de manera individual para cada sensor.

Para asegurar la correcta hidratación, se dejaron los sensores en PBS durante la noche anterior a la calibración.

Los sensores se sumergieron en un volumen de PBS en el cual se realizaron las adiciones consecutivas de los estándares de H_2O_2 . Por cada adición se dejó un tiempo de acumulación de carga de 150 segundos, donde al obtener 3 acumulaciones estables, se procedía a la siguiente adición. Se realizaron 13 adiciones donde se consiguió una $[\text{H}_2\text{O}_2]$ en la celda que varió de -8 a -2 con saltos de $0,5$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Calibración estándar en OCP

La calibración que se realizó proporcionó los datos necesarios para evaluar la respuesta del sensor CESA. Con el análisis de los datos se obtuvo una gráfica de potencial respecto al tiempo que se muestra en la Figura 9 A. En esta se aprecia como los tres sensores parten de una señal alrededor de 0 mV debido a que el WE como el RE son del mismo material (Pt).¹⁰

También se puede apreciar en la gráfica como al ir adicionando los diferentes estándares de H_2O_2 , cambiando la concentración de la celda, la respuesta del sensor evoluciona hacia potenciales más negativos con el aumento de la concentración. Esto viene explicado por el fenómeno del PM que gobierna en la superficie del electrodo del Pt en condiciones de OCP. La reducción del potencial del electrodo a valores negativos no es más que el reflejo de cómo el proceso de la ORR se ve obstaculizada con la presencia de una especie química, como el H_2O_2 , con capacidad de alterar el equilibrio del sistema.

En la figura 9 B se observa cómo se producen las situaciones 2 y 3 anteriormente descritas características del comportamiento del sensor. En el rango de concentraciones de $-5,5$ a $-4,5$ se observa cómo se produce la situación 2, donde al haber una concentración de H_2O_2 comparable

con el O_2 se produce una respuesta exponencial lineal en forma logarítmica (rango de concentración logarítmico). En cambio, en el rango de concentraciones de -4,5 a -2 se produce la situación 3, que se caracteriza por presentar una concentración de H_2O_2 tan grande en el sistema que la superficie del electrodo se encuentra saturada, dando una respuesta no lineal con la concentración. Esto hace que únicamente se haya podido extraer el rango lineal de respuesta, junto con la sensibilidad por cada sensor en la situación 2 (Figura 9 C).

A partir de la Figura 9 A se puede extraer los rangos lineales y sensibilidades de cada sensor en cada calibración tal como se muestra en la Figura 9 C. De este modo se obtiene el rango lineal y sensibilidad promedio de los tres sensores dando como resultado un rango lineal de -5.5 a -4.5 con una sensibilidad de -60.11 ± 2.31 mV/década con una reproducibilidad del 3.84% y una repetibilidad del 2.84%. Todos estos resultados eran de esperar ya que se vio en anteriores estudios como la sensibilidad podía llegar a -129.23 ± 5.10 mV/década en un rango lineal de -4.5 a -3.5.⁹ La baja sensibilidad obtenida en comparación a la referenciada se debe al diferente rango lineal en el que se encuentran. Los resultados mostraron una buena precisión entre los diferentes sensores (reproducibilidad) y entre calibraciones (repetibilidad).

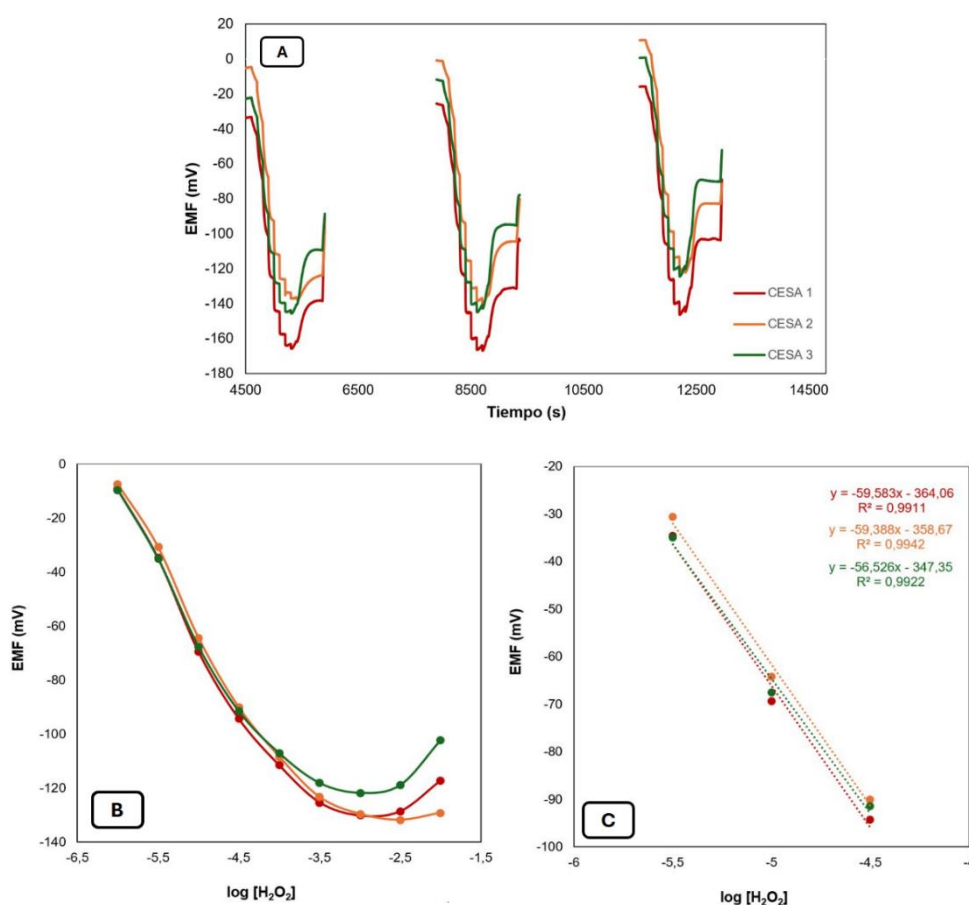


Figura 9. Representación de los resultados de la calibración estándar en OCP. Esta muestra las 9 adiciones de H_2O_2 en una celda de PBS cada 100 segundos donde la concentración va de -6 a -2 con saltos de 0,5. La figura **A** representa el potencial respecto el tiempo de las 3 calibraciones donde cada color representa un sensor. La figura **B** muestra la curva de calibración de cada sensor en la primera calibración. La figura **C** muestra el rango lineal y sensibilidad de cada sensor en la primera calibración.

Para evaluar el comportamiento del sensor en condiciones de OCP de una manera más amplia, se realizó una calibración adicional donde se amplió el rango de concentraciones al μM .

En la Figura 10 A se muestra el potencial respecto al tiempo. En esta se observa como al adicionarse el H_2O_2 el potencial experimenta un desplazamiento a valores negativos como se ha reportado en el experimento anterior. La diferencia observada está en la ampliación del rango de concentraciones. Por este motivo se distingue un nuevo rango de crecimiento distinto relacionados con el tipo de respuesta del sensor, donde se puede apreciar en la figura 10 B. Este rango es el rango de concentraciones μM (0,0316-1 μM). Este viene explicado por la situación 1, que se da cuando la concentración de H_2O_2 es menor que la de O_2 viéndose una respuesta lineal del sensor con la concentración (Figura 10 C).

A rangos de concentración μM , para los dos sensores, se obtiene un rango lineal de 0,0316-1 μM (-7,5 a -6) con una sensibilidad promedio de $-15,48 \pm 3,59 \text{ mV}/\mu\text{M}$ donde su reproducibilidad es del 23,30% y su repetibilidad del 7,65%.

La menor sensibilidad en concentraciones μM es debido directamente a la menor cantidad de H_2O_2 que se encuentra en la celda. Cuanta menos cantidad de H_2O_2 haya menor perturbación del equilibrio entre los procesos que se producen en la superficie del Pt.

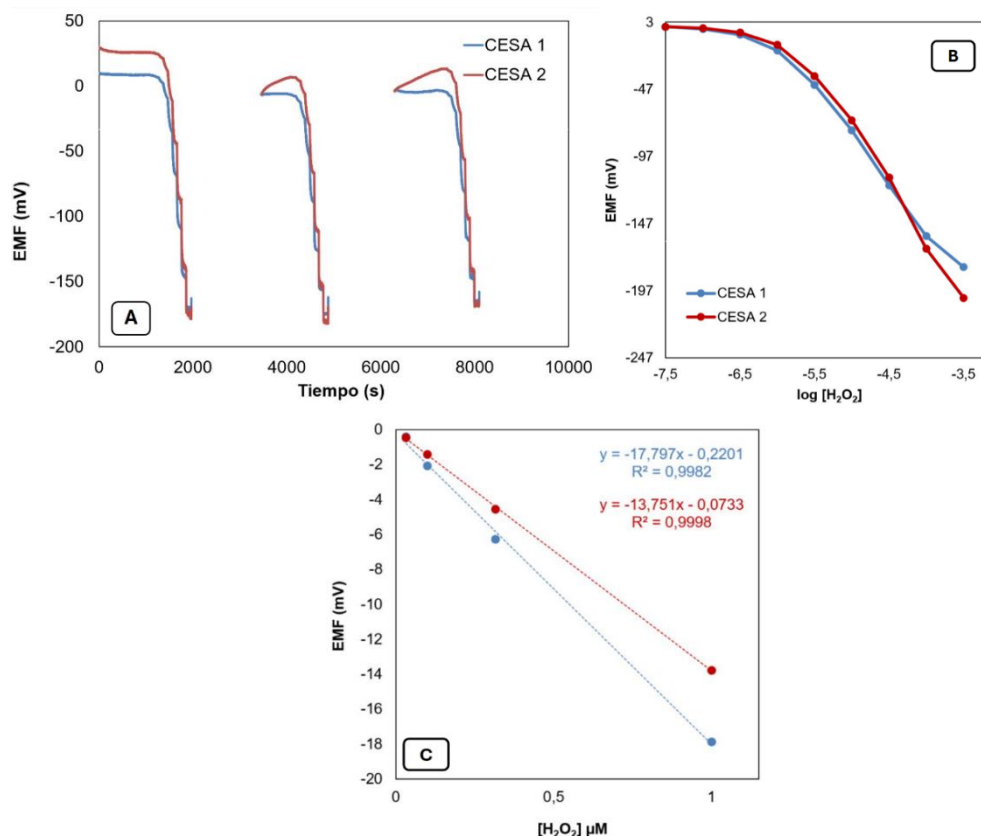


Figura 10. Representación de los resultados de la calibración estándar en OCP con ampliación del rango a concentraciones μM . Se hicieron 9 adiciones de H_2O_2 en una celda de un volumen de PBS cada 100 segundos donde la concentración va de -7,5 a -3,5 con saltos de 0,5. La figura A muestra el potencial respecto al tiempo de las 3 calibraciones realizadas con los dos CESA. La figura B representa la curva de calibración de ambos sensores en la primera calibración. La figura C representa el rango lineal con la sensibilidad de cada sensor a concentraciones μM .

5.2. Análisis de la respuesta CESA por la modulación del tiempo a distintas concentraciones

En este ensayo se puso en práctica el nuevo método de estudio. El método estándar utilizado hasta el momento en el grupo de investigación para la creación de una curva de calibración para determinar el rango lineal de respuesta de un sensor en potenciometría era la calibración estándar, la cual consiste en la adición de estándares de concentración creciente en intervalos de 100 segundos.

El nuevo método consiste en, mediante con un circuito electrónico, abrir o cerrar circuito del que forma parte el sensor.

La técnica electroquímica utilizada es la potenciometría de circuito abierto, llamada así, porque el circuito por el cual está conectado el sensor se encuentra abierto. Este circuito se cierra

iónicamente cuando el sensor es sumergido en solución habiéndose hidratado el Nafion[®], permitiendo este el intercambio iónico. El sensor en sumergirse en una solución carente de un par redox bien definido este comienza a experimentar los fenómenos ya descritos, produciéndose una acumulación de carga en el electrodo de trabajo dando como resultado la respuesta del sensor. La función del circuito electrónico es el cerrar el circuito del sensor en un tiempo determinado, cortocircuitándose, haciendo que esa acumulación de carga que se encontraba en la superficie del electrodo se pierda.

Esta situación se ve representada claramente en la Figura 11. En primer lugar, el sensor se encuentra en condiciones de OCP donde tiene una potencial estable debido a la acumulación de carga invariable en su superficie. En un tiempo determinado el circuito electrónico cortocircuitará el sistema en el que se encuentra el sensor haciendo que la acumulación de carga en su superficie se pierda. Por último, el circuito electrónico volverá a abrir el sistema para que se comience a acumular carga en su superficie.

Este método proporciona ventajas frente al estándar ya que, al realizarse el cortocircuito del sistema, el sensor se descarga totalmente, llegando a potenciales de 0 mV. Este hecho hace que se pueda estandarizar la línea base para todos los sensores de la misma manera. Cada sensor puede presentar líneas base de estabilización diferentes, alrededor de ± 20 mv, debido a factores como la fabricación del sensor y por la naturaleza del polielectrolito utilizado. Al descargar los sensores a 0 mV para seguidamente volver a OCP, abriendo el circuito nuevamente, asegura que todos los sensores comiencen a acumular carga de manera igualitaria.

El proceso de estabilización de la línea base en el MCC es mucho más rápido que en el método utilizado hasta el momento. Todo esto permite un estudio del comportamiento del sensor distinto hasta el momento.

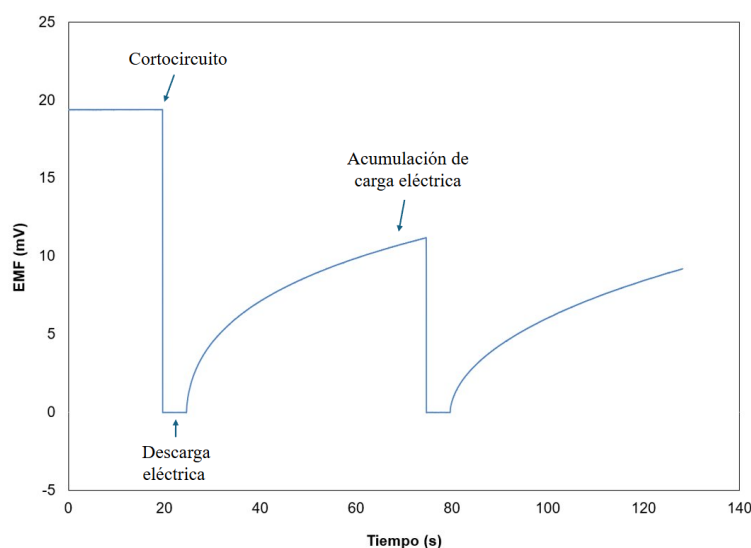


Figura 11. Representación gráfica del potencial respecto al tiempo en las distintas fases del sensor.

En la calibración estándar se estudia la acumulación de carga en el sensor de manera acumulativa, llegando a una carga máxima donde el sensor se satura. Esta viene dada por el tiempo que se deja al sensor acumular en OCP y a la concentración de analito que se encuentre en la solución. En base a ello en este experimento se evaluó la acumulación de carga del sensor (diferencia de potencial), en diferentes tiempos de OCP y en diferentes concentraciones de H_2O_2 .

El tiempo evaluado fue alrededor del tiempo normalmente utilizado en la calibración estándar que es de 100 segundos. Los tiempos de acumulación en OCP fueron 50 segundos, 100 segundos, 150 segundos y 200 segundos donde el tiempo de descarga era de 5 segundos.

Las concentraciones evaluadas fueron del rango de concentración de -6 a -3 en saltos de 1 unidad.

Por cada CESA se obtuvo una gráfica del potencial (EMF) en función del tiempo donde en esta viene representada los diferentes tiempos de OCP a cada concentración de H_2O_2 .

En la Figura 12 A se puede observar la evaluación de los diferentes tiempos de OCP para las concentraciones -6 y -5 . Las primeras series de picos decrecientes que se observan son la respuesta del sensor en los diferentes intervalos de tiempo que se deja acumular carga en OCP, donde van en orden de menor a mayor tiempo (50- 200 segundos en intervalos de 50 segundos). Esta muestra que cuando se deja más tiempo de OCP se llega a respuestas con más tendencia a valores negativos. Este hecho se aprecia de manera más clara en la segunda serie de picos

que corresponde a la acumulación en los diferentes tiempos, pero con una concentración de -5. Esta tendencia creciente a valores negativos, debido a la naturaleza de los procesos en superficie del Pt, se ve incrementada de forma significativa con la concentración de la celda como se muestra en la Figura 12 B.

Del ensayo se obtuvo la respuesta de cada sensor (determinada por la acumulación de carga) en cada intervalo de tiempo en función de la concentración de la celda como se muestra en la Figura 12. Se aprecia como en las concentraciones de -6 y -5, a mayor tiempo de OCP, hay una mayor acumulación. En contra partida, en las concentraciones de -4 y -3 hay una menor acumulación de carga con el aumento del tiempo de OCP. Estos hechos se relacionan con la base de los procesos que se producen en la superficie del Pt.

En concentraciones μM la reacción predominante del potencial mixto que determina el potencial del electrodo es la ORR. El H_2O_2 al encontrarse en una concentración tan baja este viene controlado por efectos difusivos, a causa de que este tiene que llegar a la superficie de Pt donde experimentará la reacción anódica (HPOR). Este hecho hace que en dejar mayor tiempo el sensor en OCP, se observe una mayor respuesta debido a la acumulación de carga progresiva donde viene limitado por la llegada del peróxido a la superficie de Pt. Al haber tan poca perturbación de la ORR se tiene que acumular más H_2O_2 para ver una señal más significativa, explicando así los valores de las acumulaciones en la Figura 12 C y la Figura 12 D. Por otra parte, en concentraciones logarítmicas hay un incremento en los procesos sobre el Pt, donde sumándose al hecho de que el H_2O_2 viene controlado por un régimen de Tafel, hace que no se encuentre limitado por difusión. Con ello hay una acumulación mayor de carga en menos tiempo de OCP reflejándose en la respuesta en la Figura 12 E y la Figura 12 F.

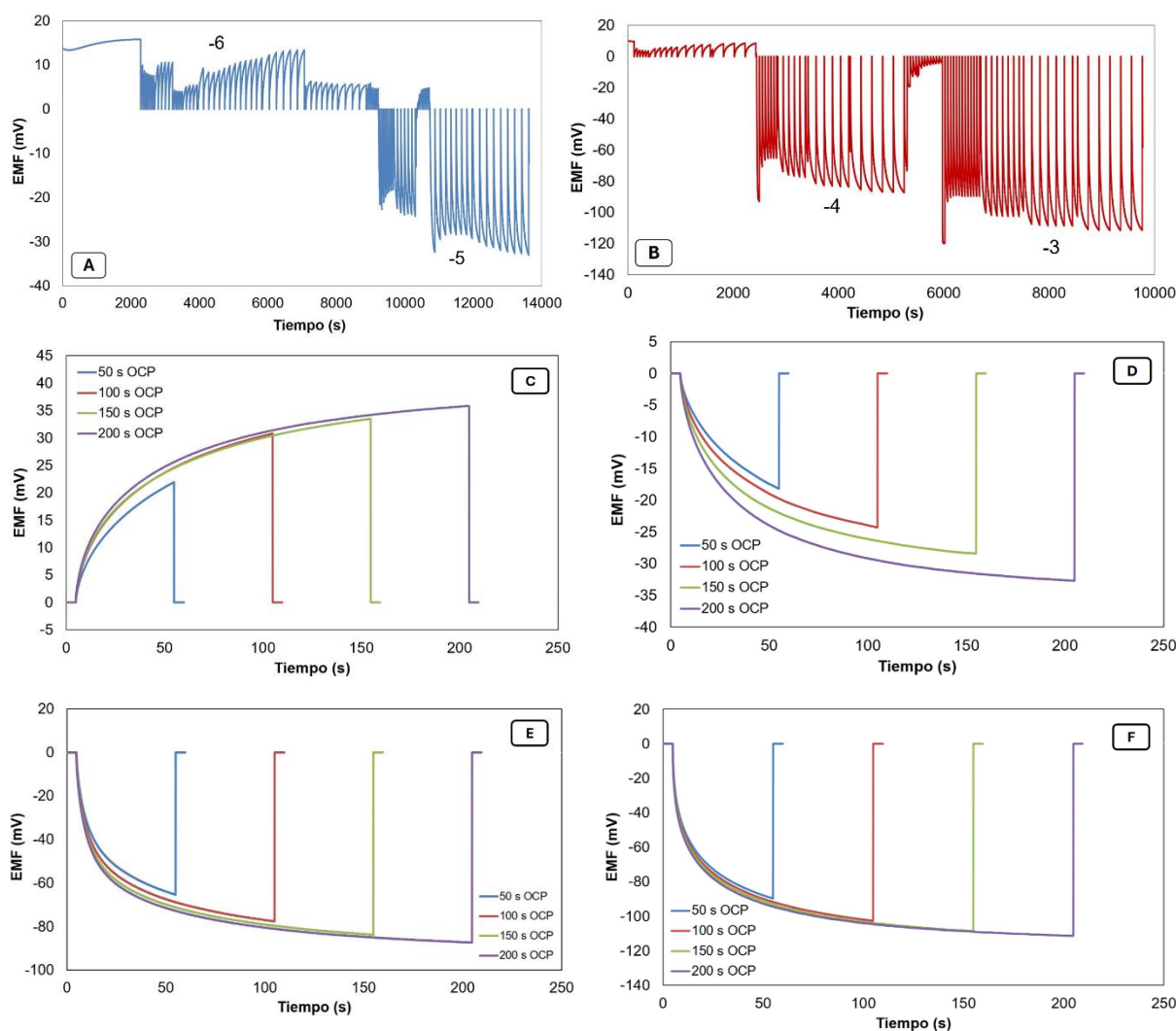


Figura 12. Evaluación de la acumulación de carga en tiempos de 50, 100, 150 y 200 s de OCP a concentraciones de -6, -5, -4 y -3 logradas por adiciones de estándares en un volumen de celda de PBS. La Figura A muestra el ensayo del sensor evaluado a los diferentes tiempos a las concentraciones de -6 y -5. La Figura B muestra el ensayo del sensor evaluado a los diferentes tiempos a las concentraciones de -4 y -3. La Figura C enseña la respuesta del sensor a los diferentes tiempos a la concentración de -6. La Figura D muestra la respuesta del sensor a los diferentes tiempos a la concentración de -5. La Figura E presenta la respuesta del sensor a los diferentes tiempos a la concentración de -4. La Figura F presenta la respuesta del sensor a los diferentes tiempos a la concentración de -3.

Por lo que se acaba de comentar, a un mismo tiempo de acumulación de carga, se acumulará diferente cantidad en el electrodo dependiendo de la concentración de analito que se encuentre presente en solución. A concentraciones μM , como ya se ha explicado, al haber menor cantidad de H_2O_2 este produce una perturbación más pequeña que en comparación a grandes concentraciones sobre la reacción ORR, haciendo que el sensor reporte una menor señal a causa de la acumulación lograda. Este fenómeno se puede observar de forma clara en la Figura 13.

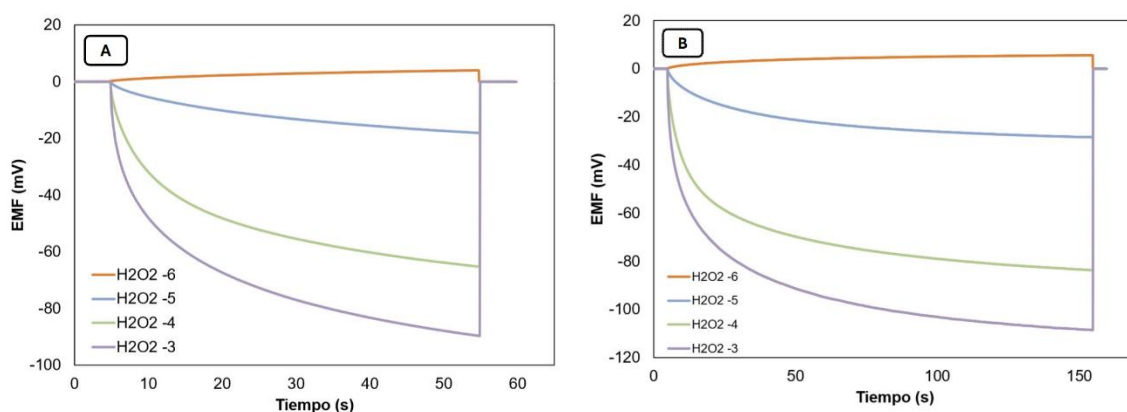


Figura 13. La figura muestra las diferentes respuestas del sensor a diferentes concentraciones en un tiempo de acumulación de carga en OCP: **A)** 50 segundos y **B)** 150 segundos.

De manera gráfica se puede apreciar como con el aumento del tiempo de OCP, la acumulación de carga en concentraciones μM aumenta, en cambio a concentraciones logarítmicas a diferentes tiempos de acumulación no varía tanto la señal como se puede apreciar en la Figura 14.

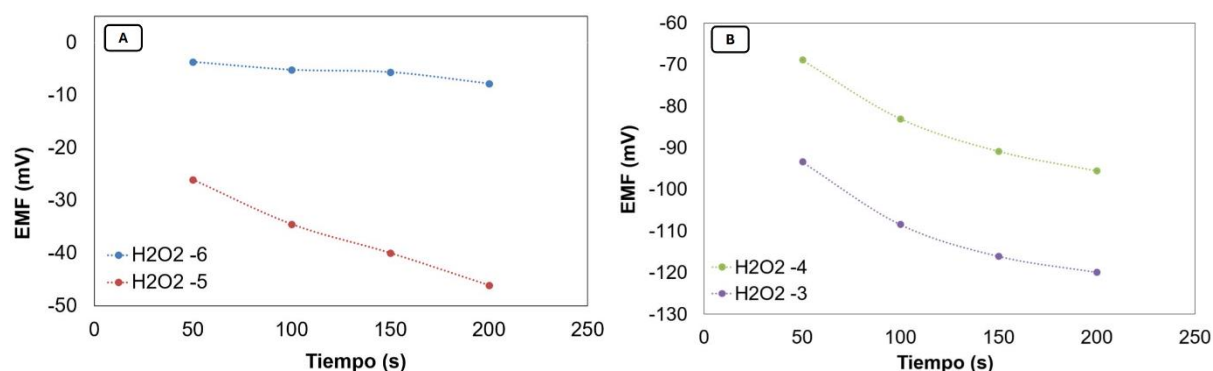


Figura 14. La figura presenta la tendencia de acumulación de carga del sensor a las diferentes concentraciones

A la concentración de -5 se puede apreciar como la respuesta aumenta en proporción al tiempo de acumulación, formando una recta de pendiente pronunciada. En la concentración de -6, en cambio, la recta formada no presenta una pendiente marcada al trabajar en concentraciones μM . Por otra parte, a concentraciones de -4 y -3 se observa como a partir de 150 segundos la acumulación de carga no aumenta demasiado en proporción al tiempo que se deja debido a que en ese tiempo ya se acerca a la acumulación de carga máxima del sensor, formándose una curva que se va allanando con el aumento del tiempo.

De este modo, en la **Tabla 1**, se representa la respuesta obtenida en los sensores a diferentes tiempos de OCP, calculada con respecto a la respuesta de 100 segundos que se considera el valor de referencia.

Tabla 1. Porcentaje de respuesta en función del tiempo de acumulación de carga.

Tiempo (s)	Respuesta -6 (%)	Respuesta -5 (%)	Respuesta -4 (%)	Respuesta -3 (%)
50	80	76	82	86
100	100	100	100	100
150	109	112	108	107
200	121	120	116	111

Tenemos que 100 segundos es el tiempo que hemos fijado como el valor de referencia haciendo que la acumulación de carga que se consigue en el sensor sea del 100%.

En el tiempo de 50 segundos en todas las concentraciones tenemos que la respuesta ha alcanzado entre el 76-86% de acumulación de carga. Se aprecia un aumento sutil con el incremento de la concentración.

A 150 segundos de acumulación se observa como el sensor a las diferentes concentraciones supera a la acumulación de referencia a 100 segundos obteniéndose mayor respuesta, entre un 7-12% más.

Finalmente, a 200 segundos se observa cómo hay una mayor respuesta creciente hacia concentraciones bajas. Este hecho se debe a lo ya expuesto anteriormente. En concentraciones μM de H_2O_2 , el sensor al dejarlo más tiempo acumular carga, mayor y más significativa será la respuesta debido a que a concentraciones μM la obstaculización de la ORR que determina el potencial del electrodo es menor, desplazándose poco el estado estacionario a potenciales negativos. Al dejar acumular más peróxido en la superficie del electrodo se obtiene mayor respuesta. Por otro lado, a concentraciones logarítmicas, al haber más cantidad de H_2O_2 se producen más procesos que desplazan al estado estacionario, haciendo que en menor tiempo de acumulación este experimente una reducción de su potencial a valores negativos.

Siguiendo la tendencia del aumento de respuesta a mayor tiempo en OCP con la disminución de la concentración, se observa como en llegar a la concentración de -6, a 150 segundos se

obtiene una menor repuesta esperada. Esto es debido que al trabajar en concentraciones μM tiene la limitación de que se puede degradar el H_2O_2 , lo que se traduce en una menor respuesta.

Con estos resultados se determinó el tiempo de acumulación de carga que se utilizaría para realizar la calibración con el MCC, donde el tiempo fue 150 segundos, debido a que se considera que la respuesta que se obtiene en todas las concentraciones es adecuada respecto al tiempo necesario que se deja el OCP.

5.3. Calibración con método de cortocircuito

Con el MCC optimizado se procedió a realizar unas calibraciones para estudiar la sensibilidad, reproducibilidad y repetibilidad de los sensores CESA.

Se realizó la calibración tal como se muestra en la Figura 15 A. A través de esta se aprecia la robustez que nos proporciona el método. Esta viene dada por modo operacional que se emplea. Mediante el abrir y cerrar el circuito del sistema en el que se encuentra el sensor, la creación de carga/descarga eléctrica sobre su electrodo sin afectar en la respuesta. Esto permite la creación de una mayor población estadística viéndose reflejado en la obtención de mínimo tres puntos por concentración durante la calibración.

En la calibración se obtuvo una curva por cada sensor como proporciona la Figura 15 B. Estas se compararon con la estructura de una calibración con el mismo modo operacional de otro estudio que seguía el mismo perfil.¹⁰

Las curvas de calibración presentaban las tres situaciones del comportamiento de la respuesta del sensor, igual que en la calibración estándar. De las dos situaciones se obtiene información analítica de interés en dos rangos de concentración distintos. Los resultados en concentraciones μM viene representada en la Figura 15 C. Las concentraciones logarítmicas proporcionan los datos como se observan en la Figura 15 D.

Se obtiene un rango lineal promedio a concentraciones μM de 0.0316-1 μM (-7.5 a -6). A este rango la sensibilidad promedio fue de $-12,21 \pm 2,06 \text{ mV}/\mu\text{M}$ con una reproducibilidad del 17,43 % y una repetibilidad del 16,39 %. Por otra parte, se obtiene un rango lineal a concentraciones logarítmicas de -5,5 a -3.5. A este rango la sensibilidad es de $-52,12 \pm 4,66$ con una reproducibilidad del 8,88% y una repetibilidad del 16,43%.

Las sensibilidades obtenidas en ambos rangos son comparables con los descritos en anteriores estudios para la calibración estándar. En este se reporta para un rango de concentración μM una sensibilidad $-8,44 \pm 2,08 \text{ mV}/\mu\text{M}$ mientras que para un rango logarítmico una sensibilidad de $-110 \pm 11,27 \text{ mV}/\text{d}{\text{c}{\text{a}}}{\text{d}}{\text{a}}$.¹⁰

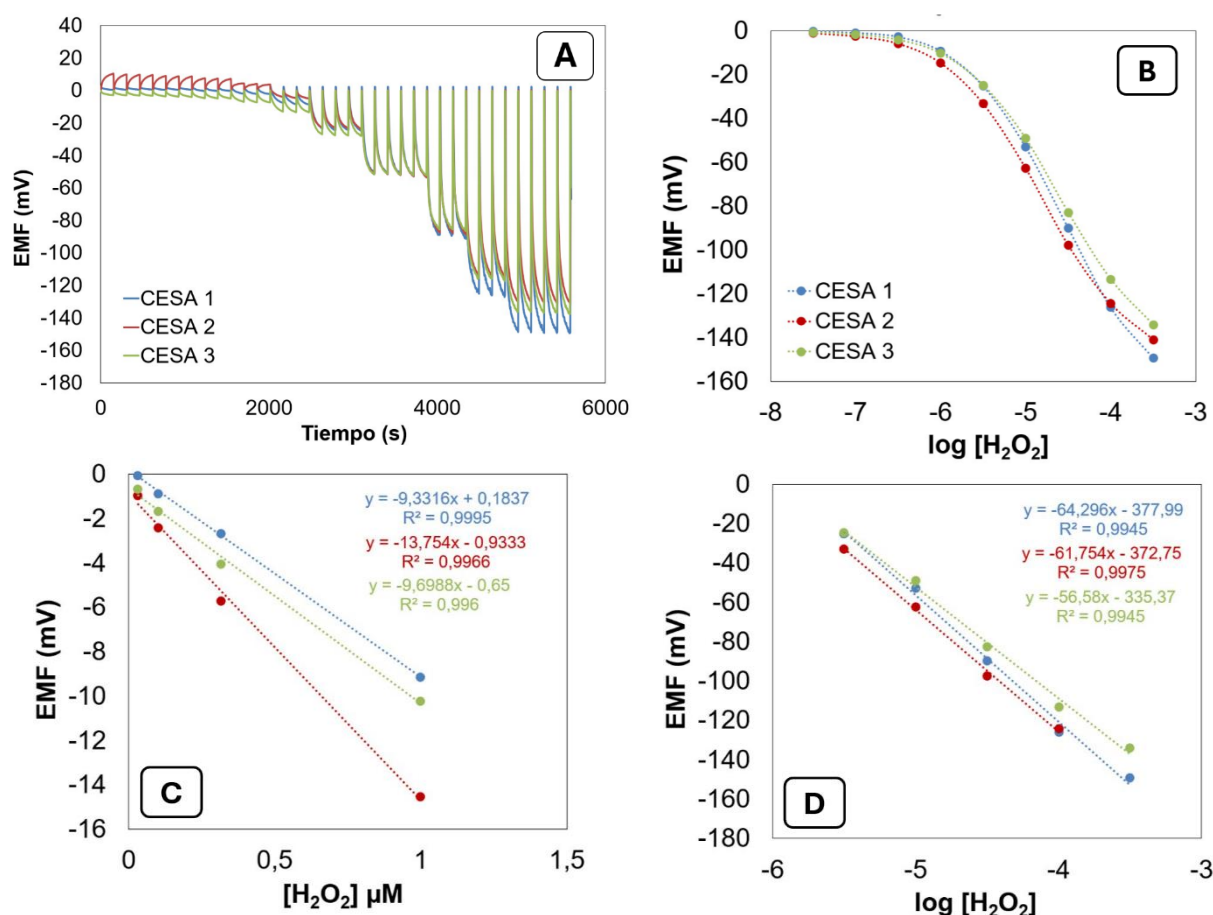


Figura 15. Calibración del sensor CESA mediante el uso del MCC. Sensores sumergidos en un volumen de PBS en el cual se realizan adiciones de H_2O_2 cada 3 picos en tiempos de 150 s de OCP donde las concentraciones son de -7,5 a -3,5 con saltos de 0,5. La Figura A muestra la primera calibración para los tres CESA. La Figura B muestra la curva de calibración de los 3 CESA. La Figura C presenta la sensibilidad y rango lineal en concentraciones μM . La Figura D enseña la sensibilidad y rango lineal en concentraciones logarítmicas.

Con el objetivo de poner a prueba los límites del sensor con el MCC se realizó una calibración adicional en la cual se amplió el rango de concentraciones, tanto a μM como logarítmicos.

Siguiendo la misma metodología durante todo el trabajo se realizó una calibración la cual viene representada en la Figura 16 A y Figura 16 B. De estas se extrajo la curva de calibración.

En esta se aprecia muy bien las tres situaciones ya comentadas que experimenta la respuesta de un sensor (Figura 16 C). Con la curva de calibración se construye una recta a concentraciones μM (Figura 16 D) y concentraciones logarítmicas (Figura 16 E).

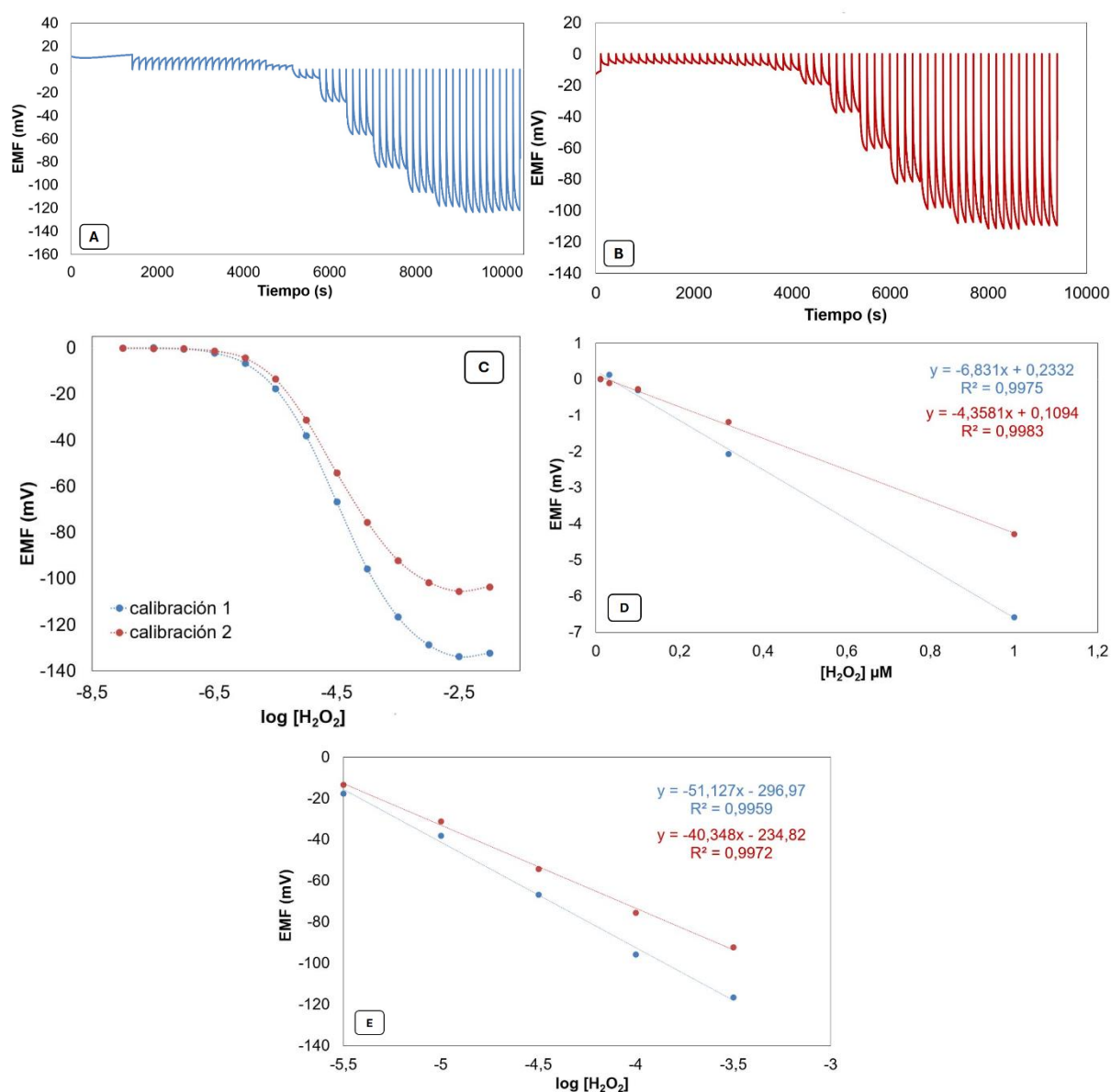


Figura16. La figura muestra la calibración por duplicado del sensor a 150 segundos de OCP. Sensor sumergido en una celda de PBS donde se realizan 13 adiciones de H_2O_2 . La concentración de la celda va de -8 a -2 con saltos de $0,5$. La figura A y B muestra el potencial respecto al tiempo del sensor. La figura C muestra la curva de calibración. La Figura D presenta el rango lineal y la sensibilidad a concentraciones μM . La figura E muestra el rango lineal y la sensibilidad a concentraciones logarítmicas.

El rango lineal promedio de los tres sensores a concentraciones μM es de 0.01-1 μM (-8 a -6), donde la sensibilidad promedio es de $-7,85 \pm 3,99 \text{ mV}/\mu\text{M}$ con una reproducibilidad del 49,48% y una repetibilidad del 38,31%. Por otra parte, a rangos de concentración logarítmicos se obtiene un rango lineal promedio de -5.5 a -3.5 con una sensibilidad promedio de $-44.29 \pm 2.80 \text{ mV}/\text{década}$ con una reproducibilidad del 6.43% y una repetibilidad del 16.56%.

Los resultados obtenidos son comparables a concentraciones μM respecto los valores bibliográficos¹⁰, mientras que a concentraciones logarítmicas difieren un poco, obteniéndose aproximadamente la mitad de la sensibilidad. Esto es debido por el uso del diferente método.

La sensibilidad a concentraciones μM lógicamente es menor que a altas debido a la menor cantidad de H_2O_2 . En los sensores, a baja concentración, se han obtenido precisiones bajas. Esto podría ser por el hecho de trabajar a concentraciones de H_2O_2 tan bajas, experimentado este una degradación dando valores tan poco reproducibles y repetibles. Esto explicaría por que a concentraciones altas se obtiene una mejor reproducibilidad y repetibilidad respecto a concentraciones μM .

La Tabla 2 compara en las concentraciones μM el rango lineal, sensibilidad, reproducibilidad y repetibilidad de cada método puesto a prueba en este estudio. La comparación de los resultados de ambos métodos se centra en este rango debido a que la detección de H_2O_2 supone un reto a causa de las dificultades de poderse detectar a estas bajas concentraciones.

En esta tabla se puede apreciar como en las concentraciones μM , el MCC, presenta unos resultados comparables.

Tabla 2. Rango lineal, sensibilidad, reproducibilidad y repetibilidad de los diferentes métodos en rangos de concentración μM

		Rango lineal [H_2O_2] (μM)	Sensibilidad ($\text{mV}/\mu\text{M}$)	Reproducibilidad (%)	Repetibilidad (%)
Concentraciones μM	Método estándar	0,0316-1	-15,48	23,3	7,65
	MCC	0,0316-1	-12,21	17,43	16,39

La modulación del tiempo de OCP con la nueva metodología ha dado como resultado una menor sensibilidad para el mismo rango lineal que en el método estándar.

Aunque la diferencia entre las sensibilidades de ambos métodos es baja, esta proviene de la propia naturaleza de la metodología. El funcionamiento del MCC se basa en la acumulación de carga eléctrica que se crea en la superficie del electrodo debido a los diferentes procesos que se producen en él. Esta acumulación es producida por la transferencia de electrones entre las especies químicas oxigenadas en solución y el Pt como la adsorción de estas mismas en su superficie creándose una diferencia de potencial. De este modo, al realizarse un cortocircuito, se descarga y se pierde esta diferencia de potencial. Esta acción tiene un efecto sobre los procesos químicos y el estado superficial del Pt, hecho que afecta la respuesta del sensor y por lo tanto en su sensibilidad. Por otra parte, en la calibración estándar en OCP, la acumulación de carga es creciente de manera constante, sin realizarse ningún tipo de descarga, sin romper ningún tipo de equilibrio establecido entre las diferentes especies químicas y el Pt dando como resultado una mayor acumulación de carga en el electrodo viéndose reflejado en la sensibilidad.

La Tabla 3 compara, de ambos métodos, los diferentes tiempos reales de análisis que lleva realizar cada uno.

Tabla 3. Tiempo total de análisis para la realización de una calibración con 9 adiciones para un sensor con los diferentes métodos

	Tiempo de estabilización de la línea base (s)	Tiempo de respuesta por adición (s)	Tiempo de recuperación/ Limpieza (s)	Tiempo total de análisis (s)
Método estándar	550	100	1500	2950
MCC	450	450	750	5250

En la tabla se observa como el tiempo de estabilización de la línea base con el MCC es menor que en el método estándar. Esto es debido a que alternar las condiciones de OCP favorece una rápida estabilización del sistema a causa de la compensación y equilibración más rápida entre los diferentes procesos que se producen en la superficie del electrodo.

El tiempo de respuesta por adición es mayor en el MCC. Esto se debe a que el tiempo de respuesta seleccionado óptimo es 150 s. Como se deja formar 3 re-equilibramientos por concentración, el tiempo de respuesta por adición es de 450 s.

El tiempo de recuperación/limpieza era menor en el MCC debido a que el cargar y descargar el electrodo favorece una recuperación más rápida del potencial.

Se observa como en una calibración, con el método estándar, requiere menos tiempo total de análisis. El resultado total es de 2950 s (50 min aprox.). Este se obtiene de la formación de la línea base en 550 s con un tiempo de respuesta de 100 s por adición y con una recuperación/limpieza de 1500 s. Por otra parte, la calibración con el MCC fue de 5250 s (1 h con 30 min aprox.) que resulta de la suma de las diferentes fases.

El método estándar tiene un tiempo de análisis menor a la del MCC por una diferencia de 40 min. No obstante, aunque el método estándar parece que se realiza en menor tiempo, este únicamente proporciona un punto por concentración. El MCC proporciona por adición 3 puntos de promedio, permitiendo obtener una mayor robustez operacional debido al aumento de la población estadística. Para obtener 3 valores de una misma concentración con el método estándar, se tendría que realizar por triplicado el análisis. Esto supone un tiempo total de 8850 s (2 h con 30 min aprox.), es decir, se requiere más tiempo de análisis para la obtención del mismo número de puntos.

6. CONCLUSIONES

English

In this work, the analytical response control of the CESA electrochemical sensor was proposed by implementing a method based on modulating the potential accumulation time at the electrode surface.

First, the sensor's response was evaluated using the reference method used by the research group. The sensor was found to provide sensitivity with accuracy (reproducibility and repeatability) comparable to that obtained in previous studies within a near-linear range.

Using the reference method evaluated, the circuit activation time was optimized by observing the effect of potential accumulation. It was observed that at μM concentrations, allowing more charge accumulation time, the sensor achieved a more significant response, while at logarithmic concentrations with a shorter OCP time, the response stabilized more quickly. Consequently, a time of 150 seconds in OCP was determined to be optimal for obtaining a good sensor response in proportion to the time required.

Once the time was optimized, calibrations were performed using the MCC to study the sensor's response behaviour. It was found that the sensor's sensitivity using the MCC was comparable to the standard method. The total analysis time required for each method was also compared. It was concluded that the total analysis time for the MCC was longer than the standard method, but it allowed for a larger statistical population.

Finally, sensor performance was evaluated using the MCC over a wide range of concentrations, resulting in lower sensitivity and lower accuracy compared to the standard method. Even so, the MCC presented promising advantages such as its operational robustness, its ability to standardize the baseline in CESAs, and a significant reduction in system stabilization time.

Furthermore, its methodology opens the door to developing a sensor capable of operating in different concentration ranges, increasing its versatility.

Castellano

En este trabajo se ha planteado el control de la respuesta analítica del sensor electroquímico CESA mediante la implementación de un método basado en la modulación del tiempo de acumulación de potencial en la superficie del electrodo.

Primeramente, se evaluó la respuesta del sensor con el método de referencia utilizado en el grupo de investigación. Se obtuvo que el sensor daba una sensibilidad con una precisión (reproducibilidad y repetibilidad) comparables a la obtenida en estudios anteriores en un rango lineal cercano.

Con el método de referencia evaluado se procedió a optimizar el tiempo de activación del circuito observando el efecto de la acumulación de potencial. Se vio como a concentraciones μM en dejar más tiempo de acumulación de carga el sensor conseguía una respuesta más significativa mientras que en concentraciones logarítmicas con un menor tiempo de OCP se conseguía una estabilización de la respuesta más rápido. En consecuencia, se determinó que el tiempo de 150 segundos en OCP era el óptimo para la obtención de una buena respuesta del sensor en proporción al tiempo requerido.

Con el tiempo optimizado se procedió a la realización de calibraciones con el MCC para estudiar el comportamiento de la respuesta del sensor. Se obtuvo que la sensibilidad del sensor en el MCC era comparable con el método estándar. También se comparó el tiempo total de análisis que llevaba realizar cada método. Se concluyó que el tiempo total de análisis del MCC era mayor que el estándar, pero permitía obtener una mayor población estadística.

Finalmente se evaluó el rendimiento del sensor aplicando el MCC en un amplio marco de concentraciones, donde se obtuvo como resultado una menor sensibilidad con una baja precisión, con respecto al método estándar. Aun así, el MCC presentó unas ventajas prometedoras como su robustez operacional, su capacidad de estandarización de la línea base en los CESA como la reducción considerable del tiempo de estabilización del sistema.

Además, su metodología de uso abre posibles puertas para la obtención de un sensor con la capacidad de funcionar en distintos rangos de concentración aumentando su versatilidad.

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Nag, A.; Mukhopadhyay, S. C.; Kosel, J. *Printed Flexible Sensors*; Springer International Publishing: Cham, 2019; Vol. 33. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-13765-6>.
- (2) Larmat González, F. E. *Sensores Electroquímicos : Teoría y Aplicaciones*, First edition.; Ciencias Naturales y Exactas; Programa Editorial Universidad Del Valle: Cali, 2022.
- (3) Baranwal, J.; Barse, B.; Gatto, G.; Broncova, G.; Kumar, A. Electrochemical Sensors and Their Applications: A Review. *Chemosensors* **2022**, 10 (9), 363. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10090363>.
- (4) Yuen, J. W. M.; Benzie, I. F. F. Hydrogen Peroxide in Urine as a Potential Biomarker of Whole Body Oxidative Stress. *Free Radic Res* **2003**, 37 (11), 1209–1213. <https://doi.org/10.1080/10715760310001616032>.
- (5) Turner, N. J. 7.12 Oxidation: Oxidases. *Comprehensive Chirality* **2012**, 7, 256–274. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-095167-6.00715-1>.
- (6) Cánovas, R.; Parrilla, M.; Blondeau, P.; Andrade, F. J. A Novel Wireless Paper-Based Potentiometric Platform for Monitoring Glucose in Blood. *Lab Chip* **2017**, 17 (14). <https://doi.org/10.1039/c7lc00339k>.
- (7) Ding, Y.; Yang, L.; Wen, J.; Ma, Y.; Dai, G.; Mo, F.; Wang, J. A Comprehensive Review of Advanced Lactate Biosensor Materials, Methods, and Applications in Modern Healthcare. *Sensors* **2025**, 25 (4), 1045. <https://doi.org/10.3390/s25041045>.
- (8) Graf, E.; Penniston, J. T. Method for Determination of Hydrogen Peroxide, with Its Application Illustrated by Glucose Assay. *Clin Chem* **1980**, 26 (5), 658–660. <https://doi.org/10.1093/clinchem/26.5.658>.
- (9) Baez, J. F.; Compton, M.; Chahrati, S.; Cánovas, R.; Blondeau, P.; Andrade, F. J. Controlling the Mixed Potential of Polyelectrolyte-Coated Platinum Electrodes for the Potentiometric Detection of Hydrogen Peroxide. *Anal Chim Acta* **2020**, 1097. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.11.018>.
- (10) Clua Estivill, M. Simplifying Electrochemical Sensing: Novel Configurations for Distributed Analysis. Ph.D. Thesis, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain, 2024. <https://hdl.handle.net/20.500.11797/TDX4442> (accessed 2025-05-31).

- (11) Cánovas, R.; Blondeau, P.; Andrade, F. J. Modulating the Mixed Potential for Developing Biosensors: Direct Potentiometric Determination of Glucose in Whole, Undiluted Blood. *Biosens Bioelectron* **2020**, *163*, 112302. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2020.112302>.
- (12) Özbek, O.; Berkel, C. Recent Advances in Potentiometric Analysis: Paper-Based Devices. *Sensors International* **2022**, *3*, 100189. <https://doi.org/10.1016/J.SINTL.2022.100189>.
- (13) Clua Estivill, M.; Baez, J. F.; Blondeau, P.; Andrade, F. J. Electrochemical Pixels: Semi-Open Electrochemical Cells with a Vertically Stacked Design. *Biosens Bioelectron* **2024**, *246*. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115877>.
- (14) Merck. *NafionTM perfluorinated resin solution*. <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/product/aldrich/527084?srsId=AfmBOor ewZ6ScGepQoMkx7B-u0ofH112hrWBQn66s0Ff0iNZg-jnhtYO> (accessed 2025-05-30).
- (15) Tahalyani, J.; Akhtar, M. J.; Cherusseri, J.; Kar, K. K. Characteristics of Capacitor: Fundamental Aspects. In *Handbook of Nanocomposite Supercapacitor Materials* /; Kar, K. K., Ed.; Springer Nature: Cham, 2020; Vol. 300, pp 1–51. https://doi.org/10.1007/978-3-030-43009-2_1.
- (16) Kościelniak, P.; Wieczorek, M. Univariate Analytical Calibration Methods and Procedures. A Review. *Anal Chim Acta* **2016**, *944*, 14–28. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2016.09.024>.
- (17) Chávez, M.; Fernandez-Merino, Á.; del Caño, R.; Sánchez-Obrero, G.; Madueño, R.; Blázquez, M.; Pineda, T. Behind the Optimization of the Sensor Film: Bioconjugation of Triangular Gold Nanoparticles with Hemoproteins for Sensitivity Enhancement of Enzymatic Biosensors. *Biosensors (Basel)* **2023**, *13* (4), 467. <https://doi.org/10.3390/bios13040467>.
- (18) Overview of CCD. In *CCD Image Sensors in Deep-Ultraviolet*; Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg; pp 7–21. https://doi.org/10.1007/3-540-27412-X_2.
- (19) Canon. *Explicación de los sensores de imagen*. Canon. https://www.canon.es/pro/infobank/image-sensors-explained/#id_2307807 (accessed 2025-05-31).

8. ANEXOS

8.1 Anexo 1

A continuación, se listan las características de toxicidad y manipulación de los reactivos utilizados durante los experimentos.

Peróxido de hidrogeno (H_2O_2):

- **Toxicidad:** Provoca quemaduras graves, provoca lesiones oculares graves y puede irritar las vías respiratorias.



- **Manipulación:** Gafas de seguridad, bata y guantes de látex.



Cloruro de potasio (KCl):

- **Toxicidad:** No es una sustancia o mezcla peligrosa de acuerdo con el Reglamento (CE) No. 1272/2008.
- **Manipulación:** Gafas de seguridad y guantes de caucho nitrilo.



Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4):

- **Toxicidad:** No es una sustancia o mezcla peligrosa de acuerdo con el Reglamento (CE) No. 1272/2008.
- **Manipulación:** Gafas de seguridad y guantes de caucho nitrilo.



Cloruro de sodio (NaCl):

- **Toxicidad:** No es una sustancia o mezcla peligrosa de acuerdo con el Reglamento (CE) No. 1272/2008.
- **Manipulación:** Gafas de seguridad y guantes de caucho nitrilo.



Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4):

- **Toxicidad:** No es una sustancia o mezcla peligrosa de acuerdo con el Reglamento (CE) No. 1272/2008.
- **Manipulación:** Gafas de seguridad y guantes de caucho nitrilo.



Dispersión de Nafion™ D-521:

- **Toxicidad:** Líquido y vapores inflamables, provoca lesiones oculares graves y puede provocar somnolencia o vértigo.



- **Manipulación:** Gafas de seguridad, bata y guantes.



8.2 Anexo 2

A continuación, se muestran los pasos de manera visual del montaje del sensor CESA paso por paso:

1. Se recortan las siguientes piezas con las dimensiones especificadas.
2. Se procede a unir WE con M_1 .
3. Se adiciona 5 μL X 2 de Nafion[®] a M_1 -WE dejando secar 10 minutos por adición.
4. Se pega RE sobre M_3 .
5. Se pega M_2 sobre RE- M_3 .
6. Se adhiere M_1 -WE sobre M_2 -RE- M_3 .
7. Se sella los bordes con pegamento instantáneo.
8. Se adicionan 5 μL de Nafion[®] en la zona activa. Se deja secar 2 horas.

