



Universidad de Oviedo

PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
ELECTRODOS DE PAPEL PARA APLICACIONES
EN BIOSENSORES

Enrique Álvarez Pérez

Trabajo fin de grado
Grado en Ingeniería Química Industrial
Curso 2020/2021

Tutores: Alfredo de la Escosura Muñiz y Adrián Fernández Gavela

Índice

1.Introducción	3
1.1. Sensores y Biosensores	3
1.2 Características analíticas de los biosensores	5
1.3. Biosensores electroquímicos	6
1.4. Electroodos serigrafiados	6
1.5. Electroodos de papel	8
2. Objetivo	10
3. Experimental	11
3.1 Materiales, aparatos y reactivos	11
3.2 Métodos y fabricación	11
4.Resultados y conclusiones	16
4.1 Análisis electroquímico	16
4.2 Caracterización morfológica por microscopía electrónica	22
4.3. Estudio del coste de un electrodo	26
4.4. Conclusiones	27
5.Bibliografía	28

1.Introducción

1.1. Sensores y Biosensores

En la actualidad existe una importante necesidad de hacer frente a los problemas analíticos que presentan sectores tan dispares como el industrial, clínico, agroalimentario, medioambiental o forense. De una manera general, los análisis químicos llevados a cabo en todos estos sectores presentan ciertos inconvenientes como son un alto precio de los nanomateriales y equipamiento analítico necesario, tiempos de análisis elevados y procedimientos complejos que solamente pueden ser realizados por técnicos especializados. Idealmente, estos problemas deben ser resueltos con dispositivos analíticos sensibles, sencillos, rápidos, fiables, de bajo coste y portátiles que permitan la detección *in situ* de las especies de interés para poder responder con gran celeridad cuando se encuentra un problema. Los sensores y biosensores químicos son dispositivos que pueden ayudar a resolver diferentes problemas analíticos con estas propiedades ideales.

Según la IUPAC, un sensor químico es un dispositivo que transforma información química en una señal analítica útil [1,2].

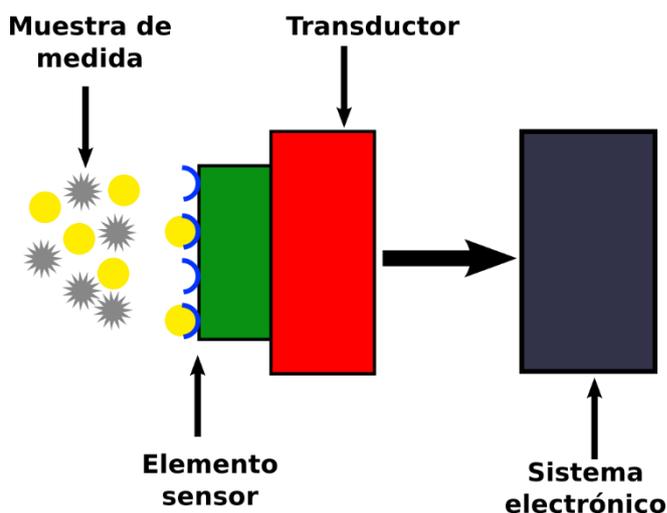


Figura 1: Esquema sensor químico

Como podemos ver en la figura 1, un sensor químico, normalmente consta de dos componentes básicos conectados: un receptor que proporciona el reconocimiento del analito de interés y un transductor fisicoquímico, que convierte la señal química obtenida en una señal física medible. Los biosensores son sensores químicos en los que el elemento sensor se basa en un sistema bioquímico. El objetivo del elemento sensor es proporcionar al sistema de un alto grado de

selectividad hacia al analito. Un sensor químico debe ser dispositivo integrado, normalmente deberían ser de pequeño tamaño y el receptor debería estar en contacto directo con el transductor para realizar la transducción directa a una señal medible.

El primer biosensor fue descrito por Leland C. Clark en 1962 [3,4]. A partir de su sensor de O_2 , descrito unos años antes, e incorporando glucosa oxidasa (GOx) en el dispositivo, fue capaz de convertir un simple electrodo de platino en un dispositivo analítico para determinar glucosa en muestras humanas. Esta invención fue el germen del sensor de glucosa tan utilizado en la actualidad para la monitorización de esta especie en personas diabéticas.

La investigación en biosensores ha crecido rápidamente en los últimos años debido a su potencial en campos como el diagnóstico clínico, monitorización de muestras medioambientales, procesos industriales o detección de agentes tóxicos/biológicos. Sin embargo, viendo la tendencia en el número de publicaciones científicas, parece que se ha alcanzado un cierto techo. Aunque se han conseguido avances importantes, no parece que haya ninguna tecnología tan notable en el mundo comercial como fue el desarrollo del sensor de glucosa.

Como en la definición de sensor o biosensor químico puede encajar una cantidad muy grande de diferentes dispositivos, existen otras clasificaciones más específicas en las que se distribuyen los sensores. Entre estas clasificaciones destacan las siguientes: según la naturaleza de la fase sensora y el mecanismo del proceso de reconocimiento, las características de transductor, si en la detección es necesaria una marca externa, o según el formato de ensayo utilizado. Por otro lado, considerando el tipo de instrumentación utilizada en los biosensores, se pueden distinguir dos categorías principales: 1) equipamiento de laboratorio sofisticado capaz de obtener medidas de interacciones biológicas complejas con gran exactitud, y 2) dispositivos portables, fáciles de usar, para análisis descentralizados. Aunque ambas modalidades pueden tener un interés inherente y resolver diferentes tipos de problemas, la utilización de biosensores portátiles de bajo coste por personas no cualificadas técnicamente, incluso por los propios pacientes, los llamados dispositivos “Point-of-Care” (POC) pueden ayudar en el futuro a la detección y monitorización de diferentes enfermedades, con la posibilidad real de mejorar la calidad de vida de las personas. Por tanto, en el desarrollo de biosensores, los principales objetivos buscados son la facilidad de manejo, rapidez y bajo coste. Diferentes configuraciones en sistemas de sensores han sido descritas, por ejemplo, mediante una sonda de inmersión (“dip-in-probe”), como el electrodo de vidrio para la detección del pH, sensores desechables con superficie plana que utilizan muy poco volumen de muestra (como los electrodos serigrafados) sensores de llenado capilar (formados por dos láminas con un espacio entre ellas que permite el movimiento de la muestra hasta la zona sensora) o las tiras de flujo lateral (que poseen una capa porosa de material que permite el movimiento por capilaridad de la muestra) [5].

1.2 Características analíticas de los biosensores

Las características analíticas de los biosensores se pueden determinar por los parámetros típicos utilizados en la caracterización de un método analítico convencional. Dichas características indican el ajuste de un sensor al comportamiento esperado, como la estabilidad de la respuesta, robustez de operación y almacenamiento. Estos parámetros estadísticos se describen a continuación [6]:

Exactitud: indica el grado de coincidencia entre el resultado determinado por el biosensor y el valor real de la muestra. Se expresa en términos de error relativo o error absoluto.

Precisión: indica el grado de coincidencia entre los resultados de medidas independientes obtenidas bajo coincidencias similares. Dentro de la precisión se pueden describir dos términos: la reproducibilidad y la repetibilidad. La reproducibilidad indica la capacidad del sensor de dar resultados similares bajo condiciones diferentes. La repetibilidad es la capacidad del sensor de dar resultados similares en una secuencia de medidas llevadas a cabo en las mismas condiciones.

Selectividad: indica el grado de discriminación de un sensor para determinar un analito sin interferencias de otras especies en la muestra. Si un contaminante de la muestra afecta a la respuesta del sensor por interactuar con la superficie sensora, esto produce interferencia no específica.

Rango dinámico: es el rango de concentraciones que es capaz de detectar el sensor.

Sensibilidad: refleja el cambio en la respuesta producido por una variación de unidad en las concentraciones. Si la respuesta del sensor viene relacionada de forma lineal con la concentración, en una recta de calibrado, la pendiente de esta recta es la sensibilidad.

Límite de detección (LOD): es la menor concentración a la cual el sensor puede proporcionar resultados fidedignos. El LOD es la menor concentración del analito que puede ser distinguida de la ausencia del analito (blanco de reactivos). Un bajo LOD se obtiene cuando tanto la respuesta como el ruido (en términos de desviación estándar) para el blanco son bajas. El límite de cuantificación es un parámetro de mayor confianza para proporcionar la menor concentración detectable por el sensor, y normalmente equivale a 3 veces el LOD.

Tiempo de respuesta: es el tiempo que transcurre desde que se añade el analito hasta que la respuesta del sensor llega a un valor prácticamente constante. Antes de llegar a este valor, el sensor funciona en régimen transitorio (su respuesta varía con el tiempo). Uno de los objetivos más importantes en el desarrollo de biosensores es disminuir el tiempo de respuesta para conseguir análisis rápidos.

1.3. Biosensores electroquímicos

Los transductores electroquímicos presentan ciertas ventajas frente a otro tipo de transducción como, por ejemplo, la relativa simplicidad y el bajo coste de los dispositivos e instrumentación de lectura, facilidad de uso o su posible portabilidad [7]. La portabilidad puede permitir su uso como dispositivos POC con instrumentos de mano. Además, la señal obtenida es eléctrica y, en consecuencia, se puede realizar la transducción directa al sistema electrónico de registro. Básicamente, un sensor electroquímico se compone de un circuito eléctrico que puede ser fácilmente miniaturizado y su coste de producción suele ser bajo. Esto permite su utilización para la monitorización *in situ* en diferentes aplicaciones. La sensibilidad de los métodos electroquímicos es independiente del volumen de muestra, por lo que se pueden utilizar bajo volúmenes. Además, cierta selectividad puede ser conseguida al ajustar las condiciones de excitación y obtención de la respuesta electroquímica [8]. La detección puede hacerse en disoluciones turbias o coloreadas, como por ejemplo sangre. Aunque con características muy prometedoras, los biosensores electroquímicos todavía no son ampliamente utilizados para llevar a cabo el diagnóstico de enfermedades clínicas en hospitales o centros médicos. Algunas razones incluyen la relativamente difícil automatización de estos dispositivos o problemas en la estabilidad de los elementos sensores.

1.4. Electroodos serigrafiados

La serigrafía es uno de los modos más antiguos de impresión. Los electroodos serigrafiados (SPEs) se presentan como un único dispositivo en el que se encuentran tres electroodos distintos [9]:

- 1) Electrodo de trabajo: Su respuesta es sensible a la concentración de analito
- 2) Electrodo de referencia: Permite aplicar un potencial conocido con exactitud, que es independiente a la concentración del analito y de otros iones. Su potencial es constante, y respecto a éste se mide el potencial del electrodo de trabajo.
- 3) Electrodo auxiliar: Es el electrodo que completa el circuito de la celda de tres electroodos, ya que permite el paso de corriente. Permite realizar análisis de procesos en los que se produce una transferencia electrónica.

La popularidad que han adquirido los electroodos serigrafiados en los últimos años es debido a las importantes ventajas que presentan frente a otro tipo de electroodos. A continuación, se destacan las principales ventajas de estos electroodos, además de las limitaciones que han servido de motivación para el presente trabajo.

1.5.1: Ventajas

Bajo coste: estos dispositivos se pueden producir en masa y de manera automatizada, por lo tanto, el coste final de cada electrodo es relativamente bajo. Estos electrodos son desechables y es por esto realmente por lo que se convierten en un gran activo dentro de los laboratorios ya que se destierran así los tediosos procesos de limpieza de los electrodos convencionales, de mayor coste.

Flexibilidad de diseño: Aunque existen diferentes diseños comerciales, es posible el diseño y fabricación personalizada. Esto concede a los investigadores poder realizar un diseño específico para una aplicación. Además, esta flexibilidad del diseño va a permitir, que según se vayan obteniendo mejoras tecnológicas en los instrumentos de medida y fabricación, puedan ser lanzados al mercado diseños novedosos y más complejos que mejoren en gran medida los electrodos actuales. Por otro lado, la cantidad de posibles materiales electródicos (cualquier polvo de un material conductor) es otra de sus ventajas, ya que se pueden desarrollar nuevos materiales que pudieran presentar excelentes propiedades electroquímicas.

Pequeño tamaño: Son dispositivos portátiles de pocos cm de largo, que pueden ser manejados y transportados fácilmente. Esto tiene ventajas tanto para el fabricante, en su almacenamiento y transporte, pero también para el usuario final, ya que permite llevarlos al lugar de análisis para realizar una determinación *in situ*, sin tener que transportar las muestras hasta el laboratorio. Otra ventaja inherente del pequeño tamaño es el bajo volumen de muestra necesario para realizar medidas.

Posibilidad de pretratamiento y modificaciones: La robustez de los materiales y los diseños de los electrodos serigrafados permiten una fácil modificación de la superficie con otro tipo de materiales para mejorar las propiedades químicas o electroquímicas que presentan su empleo en nuevas aplicaciones. Los SPEs se han modificado con numerosos materiales entre los que destacan: nanotubos de carbono, grafeno, proteínas, monocapas autoensambladas, nanopartículas metálicas o semiconductoras. Además, la superficie electródica puede ser tratada de diferentes formas para mejorar sus propiedades electroquímicas, como, por ejemplo, mediante la aplicación de un plasma o adición de especies químicas.

Rapidez de análisis: La posibilidad de trabajar con un conjunto de electrodos serigrafados casi de manera simultánea permite aumentar el rendimiento de trabajo en comparación a los electrodos convencionales. Si, además, se utilizan los últimos diseños como las tarjetas multielectródicas de 8 canales o las placas de 96 celdas, la cantidad de medidas que pueden ser realizadas con este tipo de electrodos en un tiempo fijo es muy elevada. Esto permite a los investigadores un rápido desarrollo y una optimización muy eficiente cuando se está diseñando y desarrollando una metodología para sensores o biosensores electroquímicos. Y para un usuario final, puede aumentar la cantidad de análisis que se llevan a cabo en el mismo tiempo en el que antes se

realizaba un solo análisis. Esto es muy importante en ciertas situaciones, como por ejemplo en hospitales, donde se realizan un gran número de análisis.

1.5.2: Inconvenientes

Materiales Sustratos: Este inconveniente pone el punto de partida a este trabajo y por ello se explica en el siguiente capítulo.

Electrodo quasireferencia: Este tipo de electrodo que presentan estos dispositivos no es un electrodo idealmente polarizable. Por tanto, en ciertas condiciones experimentales, el potencial de este electrodo podría no ser totalmente reproducible y estable a lo largo de un experimento. Además, el potencial de este electrodo podría variar al utilizar diferentes electrolitos de fondo y no puede ser definido de manera precisa.

Electrodo auxiliar: En los electrodos serigrafiados el electrodo auxiliar presenta menor área que el electrodo de trabajo, lo que implica que la semirreacción que se produce en el electrodo auxiliar no pueda llevarse a cabo tan rápidamente como sucedería si el área del electrodo de trabajo fuera mayor que la del electrodo auxiliar. Si la reacción en el electrodo auxiliar requiere de un potencial muy elevado para producir la densidad de corriente suficiente, este potencial puede afectar a la composición de la disolución (la misma corriente que fluye por el electrodo de trabajo debe fluir por el auxiliar, por tanto, con un área menor, la densidad de corriente que fluye será mayor, y el sobrepotencial necesario para fijar esta corriente puede ser elevado). Otra desventaja es la cercanía del electrodo auxiliar al electrodo de trabajo, ya que la reacción que se produce en el electrodo auxiliar podría llegar a interferir con la reacción en el electrodo de trabajo (por ejemplo, por un cambio de pH, si se está eliminando o generando H^+).

1.5. Electroodos de papel

El éxito de un sensor no sólo depende del eficiente reconocimiento del analito, también se ve afectado por el método de detección y la plataforma utilizada. En este contexto, el desarrollo de electrodos sensibles, robustos y baratos es esencial para el progreso de los biosensores electroquímicos, lo que ha impulsado el uso de SPEs. Estos electrodos utilizan sustratos plásticos o cerámicos como soporte sobre el que se asienta el material conductor, lo que provoca serios inconvenientes relacionados con la generación de residuos no biodegradables.

Estas limitaciones pueden superarse mediante el uso de papel como plataforma para la producción de electrodos, gracias a la biodegradabilidad y bajo coste de la (nitro)celulosa.

Además, de estas ventajas, hay estudios que demuestran que el hecho de que el papel presente una mayor porosidad que las plataformas plásticas o cerámicas hace que aumente el área efectiva

del electrodo [10]. Esto se explica porque, al aplicar la tinta sobre el papel ésta es absorbida por el mismo, lo que provoca que el material de carbono se acumule en ciertas áreas ordenadas de acuerdo con la distribución microporosa. Sin embargo, cuando la tinta se aplica sobre plataformas plásticas o cerámicas, debido a el hecho de que la tinta tiene la misma fluidez que el disolvente, se genera una cobertura casi uniforme en la superficie. Se puede ver entonces que en las plataformas de papel se configura un electrodo en tres dimensiones, mientras que con las plataformas clásicas se obtiene un electrodo mucho más plano. Esta diferencia en la estructura es probablemente el factor más importante en el mejor comportamiento electroquímico de los electrodos de papel.

Además, los electrodos sobre soporte papel permitirían la incorporación de detección electroquímica en sistemas biosensores basados en plataformas de papel, como las tiras de flujo lateral. Esto permitiría combinar las ventajas de ambos sistemas: i) la alta integración de los ensayos de flujo lateral (sin necesidad de etapas de lavado, etc.) y ii) la alta sensibilidad y carácter cuantitativo de la detección electroquímica.

Por último, el papel es un material de bajo coste, lo que hace que sea muy interesante para aplicaciones en países en vías de desarrollo, donde la escasez de medios impide realizar análisis laboriosos y costosos, y hay muy poca oferta de personal capacitado. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, los dispositivos de diagnósticos para países en desarrollo deben cumplir el criterio que llaman ASSURED, que constituye las siglas en inglés de una serie de características: affordable (asequible), sensitive (sensible), specific (específico), user-friendly (fácil de usar), rapid and robust (rápido y robusto), equipment free (que no necesite instrumentación sofisticada) y deliverable to end users (distribuable a los usuarios).

Sin embargo, la impresión por serigrafía de electrodos sobre papel acarrea problemas, relacionados con la extrusión necesaria para la aplicación de las tintas, que provoca daños en el papel. Además, la nitrocelulosa tradicionalmente utilizada para la impresión de estos electrodos tiene un relativo alto coste, además de su limitada disponibilidad en determinados ámbitos.

En este contexto y para superar estas limitaciones, en este trabajo se propone la preparación de electrodos de carbono utilizando papel de oficina como soporte y evitando técnicas de serigrafía.

2. Objetivo

El objetivo de este trabajo consiste en proponer una solución al problema que presenta la utilización de sustratos plásticos y cerámicos en la preparación de electrodos. Más concretamente nos centraremos en construir un electrodo de carbono, utilizando como sustrato papel de oficina, sin necesidad de técnicas de impresión por serigrafía. Se diseñará el electrodo, se optimizarán las condiciones de curado y se caracterizará tanto electroquímicamente como mediante microscopía electrónica.

3. Experimental

3.1 Materiales, aparatos y reactivos

- Papel de oficina 80 g/m² (Navigator Universal; España)
- Potenciostato Autolab PGSTAT 10 (Metrohm; Suiza)
- Electrodo de referencia de plata/cloruro de plata (CH Instruments, Inc; USA)
- Electrodo auxiliar de hilo de platino (Alfa Aesar; USA)
- Estufa Nabertherm (Selecta; Alemania)
- Celda electroquímica de metacrilato (fabricación propia)
- Vibrador/agitador LBX V05 (Labbox; España)
- Baño termostático LBX H03D (Labbox; España)
- Ingletadora telescópica (Makita; España)
- Ferrocianuro potásico (K₄[Fe (CN)₆]) (Sigma Aldrich, España)
- Nitrato potásico (KNO₃) (Sigma Aldrich, España)
- Tinta de carbón SRCE-001 (Mateprincs, España)
- N, N-dimetilformamida-DMF (C₃H₇NO) (Sigma Aldrich, España)

3.2 Métodos y fabricación

Tinta de carbono: Para la fabricación de la tinta de carbono, se prepara una disolución al 30% en peso de tinta SRCE-001 en N, N-dimetilformamida (DMF). Una vez tenemos la mezcla realizamos una primera homogenización en un agitador/vibrador para tubos (figura 2A) y por último realizamos una segunda homogenización de una hora en un baño de ultrasonidos (figura 2B).

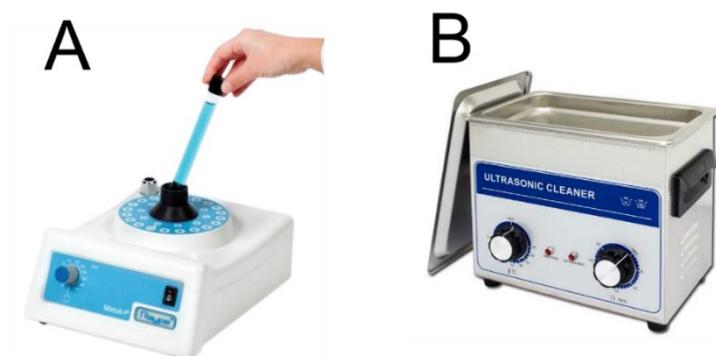


Figura 2: A. agitador/vibrador y B. baño de ultrasonidos

Diseño del electrodo: Los electrodos de papel se diseñaron a razón de cumplir las medidas que marca las dimensiones de la celda electroquímica. Las dimensiones del electrodo en ancho x largo son 1.5 x 3.5 cm. El diseño se realizó con el programa Inkscape y posteriormente se realizó el corte de cada electrodo usando un cúter como se muestra en la figura 3.

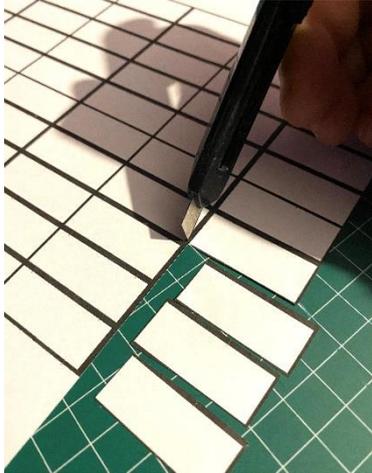


Figura 3: Corte de electrodos papel

Inmersión de electrodos en la tinta de carbono: Una vez la tinta está preparada se introduce en un recipiente de plástico que hace las funciones de mini-tanque (figura 4A) para que se introduzcan uno a uno cada electrodo de papel, con la ayuda de unas pinzas. Una vez introducidos se dejan 5 segundos y se colocan en la plataforma de secado (figura 4B).

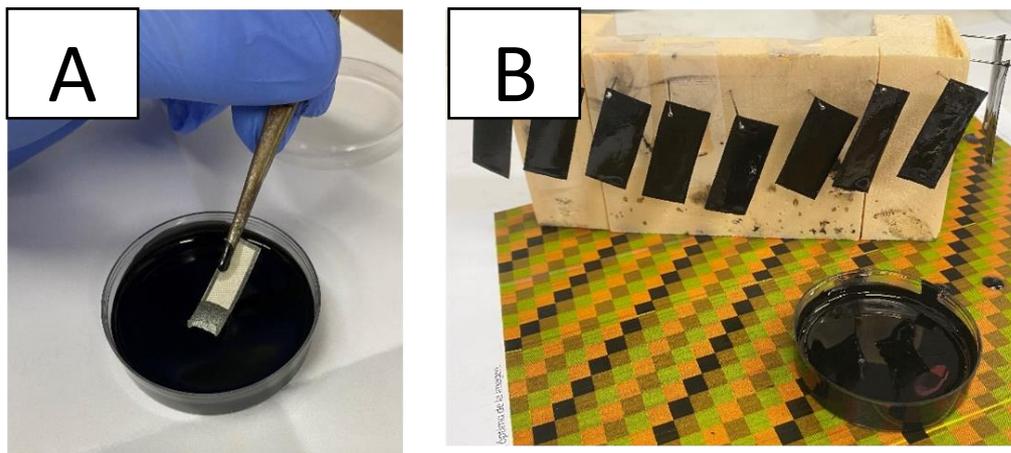


Figura 4: A. inmersión de los electrodos de papel en tinta y B. colocación de los electrodos en la plataforma de secado.

Secado y curado: Se fabricó una plataforma de poliespán para poder colocar los electrodos tintados con la ayuda de unas agujas. Se requería una plataforma que permitiera colocar los electrodos de papel de tal forma que el contacto con cualquier material fuera el menor posible, ya que esto provocaría una pérdida de tinta de carbono importante. La segunda característica consistía en cumplir las medidas que la mufla (dispositivo de secado donde se introducirá la plataforma con los electrodos) nos permite: no sólo debe de entrar en la mufla si no que debe ocupar una mínima cantidad de espacio, ya que es un dispositivo muy utilizado dentro del laboratorio y el secado de estos electrodos es de larga duración. Por lo tanto, la relación entre ocupar poco espacio junto con abarcar la mayor capacidad de electrodos posibles hizo que se optara por un diseño en forma de “C” de medias 170x70 mm. En las siguientes figuras se puede ver la fabricación realizada con la ayuda de una ingletadora telescópica (figura 5A). Se realizaron tres piezas ya que la plataforma se configura como un puzle, en la pieza central se encuentran las aletas que harán las funciones de macho para poder introducirse en las hendiduras de las piezas laterales (figura 5B).

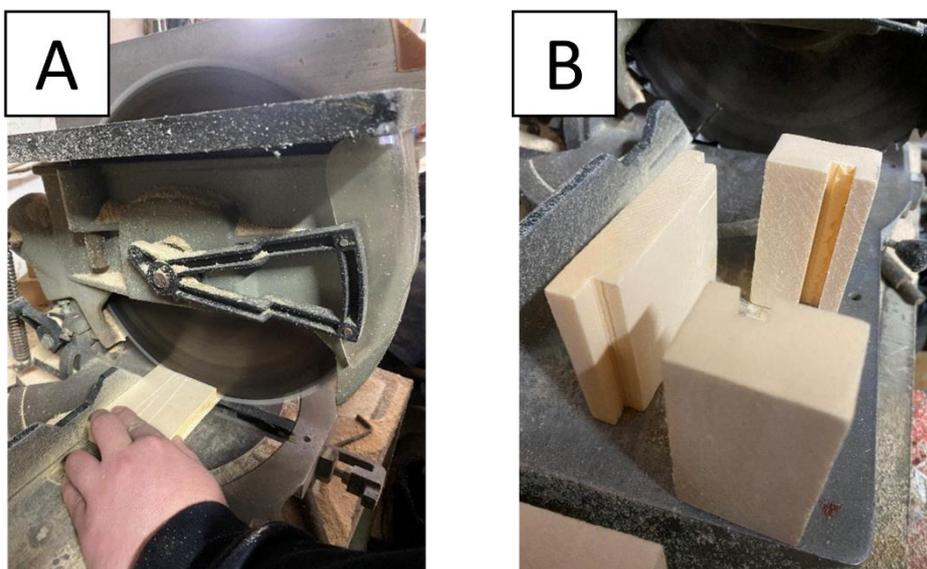


Figura 5: A. *ingletadora telescópica* y B. *despiece de la plataforma de secado*.

Como ya se ha mencionado anteriormente, tanto el secado como el curado de los electrodos se realiza en una mufla a unos 60°C. En la figura 6 se muestra tanto la mufla como la plataforma.



Figura 6: Electrodo sobre la plataforma de secado, en el interior de la mufla.

Montaje de la celda electroquímica: Para el ensamblaje del electrodo, se utilizan dos bloques de metacrilato, conteniendo uno de ellos un orificio cilíndrico de 8 mm de diámetro que constituirá la celda electroquímica, como se muestra en la figura 7.

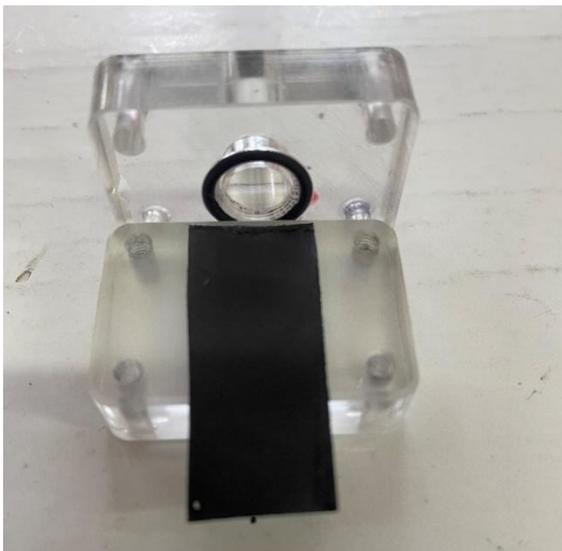


Figura 7: Celda con el electrodo de papel. El segundo bloque de metacrilato contiene un orificio de 8 mm de diámetro que define el área de trabajo del electrodo y una celda electroquímica de 450 μ L de volumen.

Una vez se coloca el electrodo de carbono y fijados los dos bloques con unos tronillos, se completa la celda electroquímica con un electrodo auxiliar de platino y un electrodo de referencia de plata/cloruro de plata. Finalmente, se introduce en la celda 450 μL de ferrocianuro potásico 2 mM en 0.2 M de nitrato potásico y se procede con la medida voltamperométrica (figura 8).

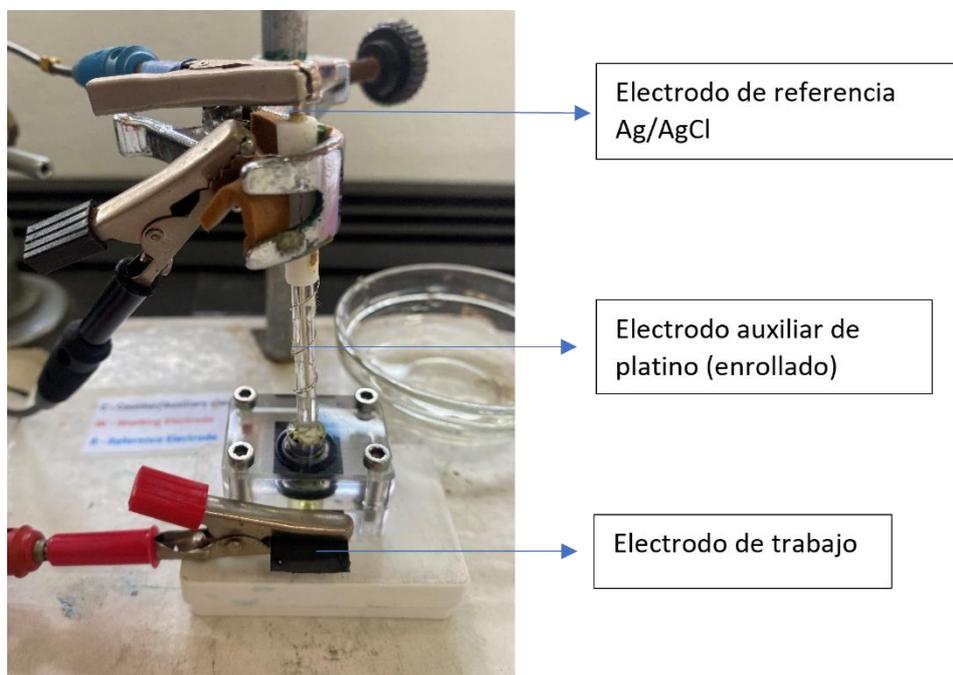


Figura 8: Disposición de la celda electroquímica

Evaluación electroquímica: Se realizan barridos por voltamperometría cíclica con la ayuda de un potenciostato. El barrido se realiza a diferentes velocidades: 100, 50 y 10 (mV/s), obteniendo así un pico correspondiente al proceso de oxidación de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ y otro correspondiente al proceso de reducción inverso.

Caracterización óptica (SEM): El microscopio electrónico de barrido es un tipo de microscopio electrónico capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra, utilizando las interacciones electrón-materia. Para la caracterización por SEM de los electrodos preparados, se cortaron piezas de 0.75 x 1.75 cm, que se metalizaron con oro previo su análisis.

4. Resultados y conclusiones

4.1 Análisis electroquímico

Se estudiaron diferentes tiempos de secado/curado para diferentes temperaturas. Para decidir qué condiciones de curado dan lugar a electrodos con buena funcionalidad, se estudió su comportamiento por voltamperometría. Para ello, se realizó un estudio en el que se utilizaron 10 electrodos de cada tipo para poder así obtener una respuesta representativa. Se analizaron las medidas por voltamperometría cíclica en $K_4[Fe(CN)_6]/KNO_3$ de cada uno de ellos, a una velocidad de barrido de 100 mV/s.

Los voltamperogramas en los que no se encuentran picos de oxidación bien definidos, así como un gran desplazamiento de potencial entre los mismos, se entenderá que corresponden a electrodos no funcionales. Una gráfica de este tipo la podemos observar en la figura 13A. Por el contrario, si el voltamperograma muestra procesos de oxidación y reducción bien definidos, con un pequeño desplazamiento de potencial entre los mismos (figura 13B), se entenderá que el electrodo funciona correctamente.

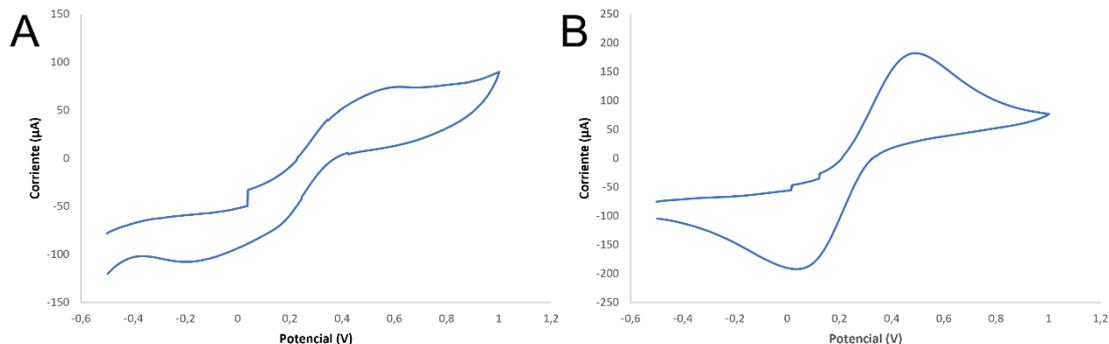


Figura 13: Voltamperogramas cíclicos correspondientes a electrodos no funcionales (A) y a electrodos cuyo proceso de curado es adecuado para que funcionen correctamente (B). Medidos a 25°C; rango de barrido: de -0.5V a +1.0V; velocidad de barrido 100mV/s; medio: 2mM $K_4[Fe(CN)_6]/0.2M KNO_3$.

Los resultados del estudio mostraron que, para determinadas condiciones, se obtiene una buena respuesta voltamperométrica, indicando un correcto curado de los electrodos. Sin embargo, para las temperaturas más bajas y tiempos de curado menores, no se obtiene buena respuesta. En la tabla 1 se indican las condiciones de curado que mostraron buen funcionamiento (✓) frente a las que resultaron insuficientes (✗).

Tabla 1: Comparativa de funcionamiento entre diferentes condiciones de curado de los electrodos.

	<u>2 horas</u>	<u>4 horas</u>	<u>Durante la noche</u>
60°C	x	x	✓
80°C	x	✓	✓
40°C	x	x	x

Además, se optimizó el número de etapas de inmersión (que llamaremos “capas”) de los electrodos en la tinta de carbono y así ahorrar tiempo y material. Para ello se compararon dos tipos de electrodos, el primero con una sola capa y el segundo con dos capas (todos ellos con las condiciones de secado a 60°C durante la noche). El estudio se realizó con 10 electrodos de cada tipo.

Se realizó una evaluación por voltamperometría cíclica a una velocidad de barrido de 100 mV/s y un rango de barrido de -0.5 V hasta +1.0 V. Una vez se obtuvo el voltamperograma se escogió el valor de la corriente de pico de oxidación como señal analítica, para cada uno de los electrodos.

A partir de estos datos, se calcula la reproducibilidad con la ayuda de la siguiente formula:

$$RSD(\%) = \frac{\text{desviación estandar (Valores)}}{\text{PROMEDIO (Valores)}} \times 100$$

Cuanto mayor sea dicho porcentaje peor será la reproducibilidad, ya que más alejados estarán los valores unos de otros. Se comprueba fácilmente en la tabla 2 que con una única capa se obtiene una mala reproducibilidad en los electrodos.

Tabla 2: Valores de RSD obtenidos para los picos de oxidación registrados con electrodos preparados con diferentes etapas de inmersión (capas) en la tinta de carbono.

	<u>UNA CAPA</u>	<u>DOS CAPAS</u>
RSD (%)	81	7

A partir de los resultados mostrados en la tabla 2, se procedió a la comparación de voltamperogramas obtenidos para electrodos preparados utilizando las condiciones de secado que resultaron satisfactorias: 80°C durante la noche, 60°C durante la noche y 80°C cuatro horas. En la figura 14 se puede ver dicha comparativa.

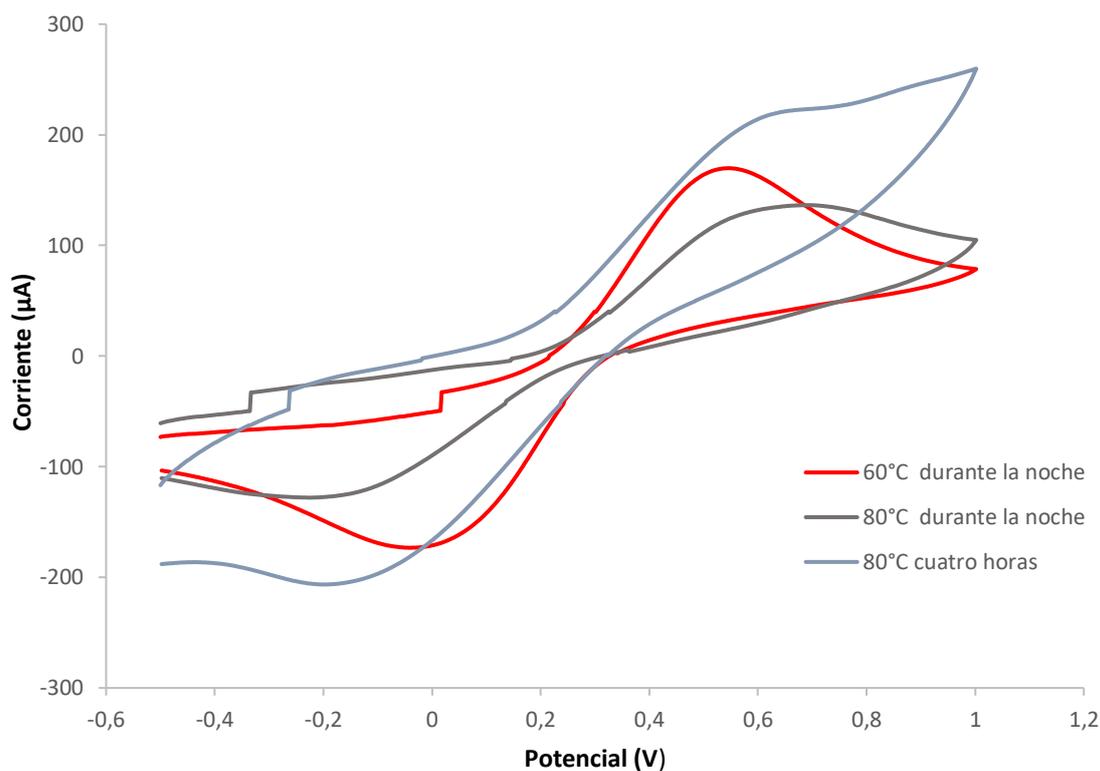


Figura 14: Comparativa de los voltamperogramas cíclicos obtenidos para electrodos preparados con diferentes condiciones de curado: 80°C durante la noche, 60°C durante la noche y 80°C cuatro horas. Medidos a 25°C; rango de barrido: de -0.5V a +1.0V; velocidad de barrido 100mV/s; medio: 2mM $K_4[Fe(CN)_6]$ /0.2M KNO_3 .

Analizando los picos de oxidación/reducción obtenidos en la gráfica, se observa una gran diferencia entre los electrodos fabricados a 60°C con un curado de más de 8 horas, respecto a los electrodos curados a 80°C, tanto durante 4 horas como más de 8 horas.

A raíz de estos resultados, se puede afirmar que los mejores electrodos se obtienen tras un curado de las tintas a 60°C durante la noche.

Posteriormente, se procedió a estimar el área efectiva de los electrodos preparados bajo estas condiciones óptimas. Se distinguen fundamentalmente dos tipos de procesos que explican el transporte del analito, los cuales se diferencian en la influencia de la velocidad de barrido (v) sobre la intensidad de corriente [11].

- Proceso de difusión: Obedece la ecuación de Randles-Sevcik que a 25°C es la siguiente:

$$i_{max} = i_p = (2.69 \times 10^5) n^3 A C_{ox}^* D_{ox}^{\frac{1}{2}} V^{\frac{1}{2}}$$

- Proceso de adsorción: Obedece la siguiente ecuación a 25°C:

$$i_{max} = i_p = (9.39 \times 10^5) n^2 A \Gamma V$$

Donde:

V: Velocidad de barrido ($\frac{V}{s}$).

n: número de electrones de la reacción redox del ferrocianuro potásico.

D_{ox}: Coeficiente de difusión del ferrocianuro potásico en KNO₃ ($\frac{cm^2}{s}$).

C_{ox}: Concentración del ferrocianuro potásico ($\frac{mol}{cm^3}$).

i_p: Intensidad máxima positiva que alcanza el voltamperograma cíclico (Amperios).

A: Área efectiva del electrodo.

Por tanto, para conocer cuál es el proceso controlante de la reacción electroquímica se puede realizar un estudio del analito a una concentración constante mediante voltamperometría cíclica a diferentes velocidades de pico en función de v o $v^{1/2}$, y en función de la linealidad de cada una de ellas se puede conocer información del tipo de proceso electroquímico, ya sea controlado por difusión o adsorción [11]. Posteriormente, a partir de la ecuación que determina el proceso, se puede estimar el área efectiva del electrodo.

Por tanto, para calcular el área efectiva se realizan voltamperogramas cíclicos a diferentes velocidades de barrido (10, 50 y 100 mV/s) (figura 15). Cada medida se hace por duplicado, utilizando dos electrodos diferentes. Una vez se realizan las medidas de cada electrodo, se procede al tratamiento de los datos.

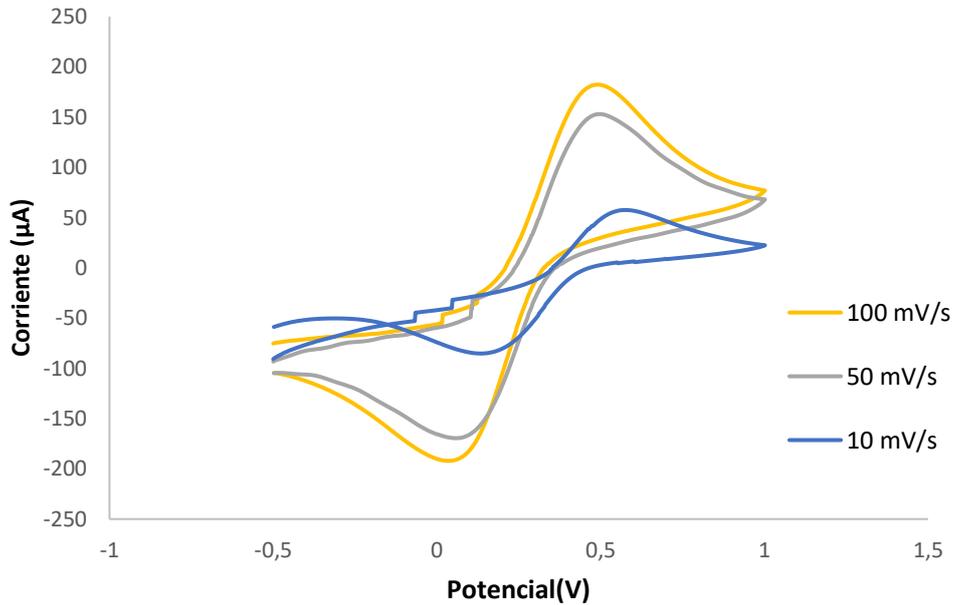


Figura 15: Comparativa de los voltamperogramas cíclicos obtenidos a diferentes velocidades de barrido (10, 50 y 100 mV/s) para electrodos preparados bajo condiciones de curado a 60°C durante la noche. Medidos a 25°C; rango de barrido: de -0.5V a +1.0V; medio: 2mM $K_4[Fe(CN)_6]$ /0.2M KNO_3 .

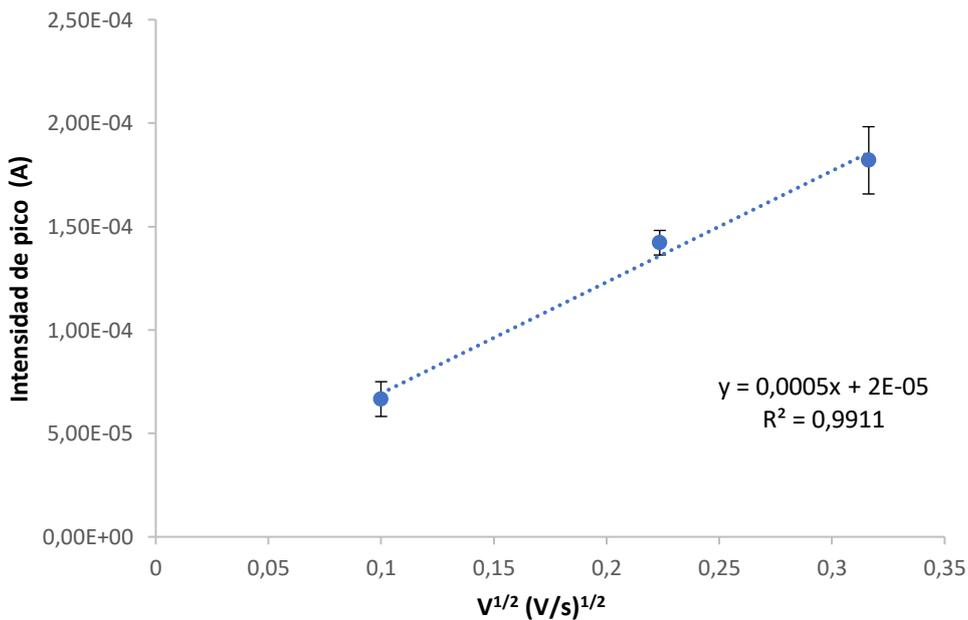


Figura 16: Representación de la intensidad de corriente del pico anódico (proceso de oxidación) frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (a partir de los datos mostrados en la figura 15)

Como se puede observar en la figura 16, se obtiene una relación lineal entre la intensidad de corriente del pico anódico y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, lo que indica que el proceso está controlado por difusión. Por tanto, a partir de estos datos y aplicando la ecuación de Randles-Sevcik, se puede determinar el área efectiva del electrodo.

Teniendo en cuenta que:

$$n = 1$$

$$D_{\text{ox}} = 6.36 \times 10^{-6} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$$

$$C_{\text{ox}} = 2 \times 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{cm}^3}$$

Introduciendo estos valores en la ecuación y operando, se obtiene que:

$$i_p = (1.36 \times 10^{-3}) A v^{\frac{1}{2}}$$

Ahora aplicando la ecuación de la regresión lineal que se obtuvo en la grafica 16, se resuelve la ecuación:

$$y = 0.0005x + 2 \times 10^{-5}$$

$$\frac{i_p}{v^{\frac{1}{2}}} = 0.0005$$

$$A = \frac{0.0005}{1.36 \times 10^{-3}} = 0.37 \text{ cm}^2$$

Teniendo en cuenta que el área real del electrodo es de 0.5 cm², el valor de área efectiva obtenido (0.37 cm²) es muy elevado (aproximadamente el 75% del área real). Teniendo en cuenta que los valores de área efectiva obtenidos en electrodos serigrafiados de carbono (sobre plataformas plásticas o cerámicas) suelen ser de aproximadamente el 10% del área real de los electrodos, nuestros resultados corroboran el efecto beneficioso de la plataforma de papel. Esto concuerda con lo esperado, debido a la porosidad del papel y al carácter tridimensional del electrodo conseguido, comparado con las plataformas clásicas basadas en materiales plásticos y cerámicos [12].

4.2 Caracterización morfológica por microscopía electrónica

Una vez se realizaron los análisis electroquímicos, se decidió analizar mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) los electrodos preparados bajo diferentes condiciones: 60°C, una capa, curado durante la noche; 80°C, dos capas, curado durante la noche; 60°C, dos capas, curado durante la noche.

Con estas características diferentes, se quiere ver si existe alguna diferencia morfológica tanto en superficie como en el interior del papel, que justifiquen los resultados electroquímicos.

Primero de todo se analizó el papel de oficina utilizado como sustrato, sin tinta de carbono. Las imágenes se realizaron a 500 aumentos.

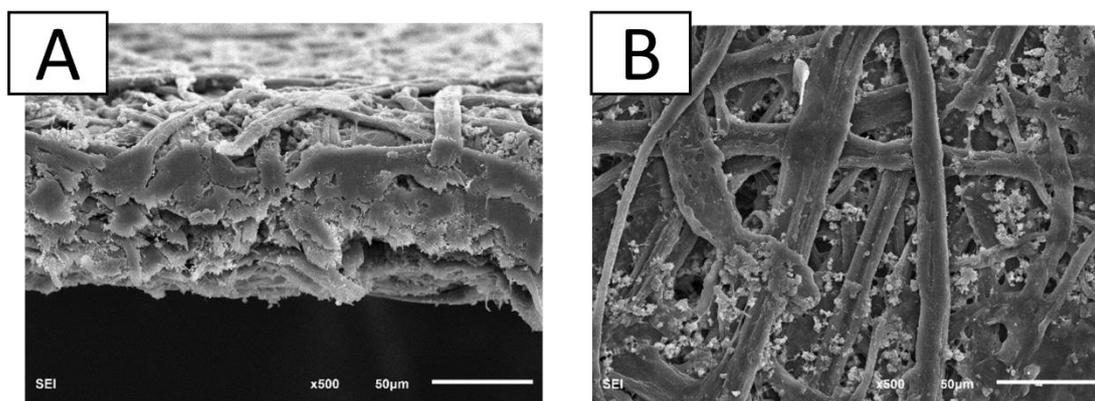


Figura 17: Imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM) correspondientes al papel de oficina usado como sustrato, sin tinta de carbono: A. interior del papel (corte transversal) a 500 aumentos y B. superficie del papel a 500 aumentos.

Como se muestra en la figura 17, la celulosa se observa como un conjunto de filamentos de cierto grosor y entrelazados con una disposición irregular. Además, se observan unas partículas adheridas a dichos filamentos, como se aprecia claramente en la figura 17B. Estas partículas son probablemente partículas de calcio, ya que en un análisis cualitativo de los compuestos se encontró el calcio en una cantidad importante (como se mostrará en figuras posteriores). Esto tiene su explicación ya que en la producción de celulosa el calcio es un componente muy utilizado, ya que facilita la laminación del papel.

En cuanto a los sustratos de papel modificados con las tintas de carbono (electrodos), se han elegido tres condiciones diferentes. Primero, para poder ver la diferencia morfológica que supone la modificación con una o dos capas de tinta, en las condiciones de secado consideradas óptimas. Además, se quiere comprobar qué diferencia morfológica se obtiene cuando se aumenta la temperatura para el mismo tiempo de secado.

A continuación, se muestran las imágenes obtenidas para las citadas condiciones de fabricación de los electrodos:

- 1) 60°C una capa, curado durante la noche:

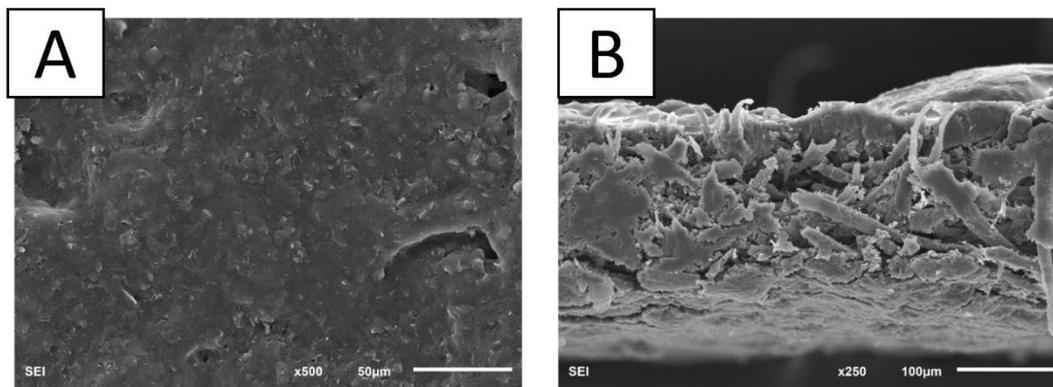


Figura 18: Imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM) correspondientes al electrodo de una capa y curado a 60°C durante la noche: A. superficie del electrodo a 500 aumentos y B. interior del electrodo (corte transversal) a 250 aumentos.

Como se aprecia en la figura 18A, con una sola capa encontramos una especie de “cráteres” a lo largo de toda la superficie. También en la figura 18B se aprecia un bajo grosor de capa de carbono, tanto en la parte superior como inferior. Si bien es cierto que teniendo en cuenta que los filamentos pertenecen a la celulosa, sí que encontramos un buen nivel de mezcla entre el carbono y el papel. Todo esto junto con los datos que nos proporciona el análisis electroquímico se puede teorizar que dichos cráteres son perjudiciales a la hora de fabricar un electrodo, ya que estas irregularidades en la superficie provocan una irreproducibilidad de los electrodos.

2) 80°C dos capas, curado durante la noche:

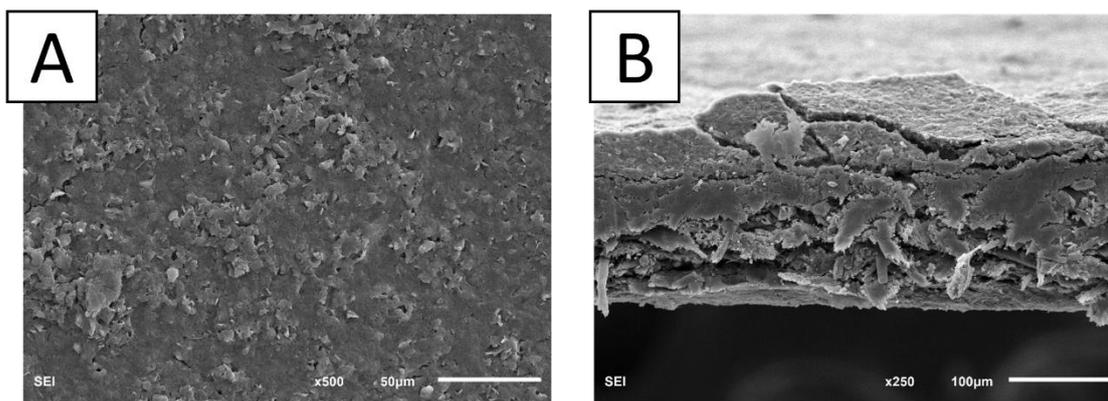


Figura 19: Imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM) correspondientes al electrodo de dos capas y curado a 80°C durante la noche: “A” superficie del electrodo a 500 aumentos y “B” perfil del electrodo (corte transversal) a 250 aumentos.

A diferencia de los anteriores, como se observa en la figura 19B se encuentra mucha más cantidad de carbono tanto en la superficie superior como inferior. Por otra parte, como se aprecia en la figura 19A no encontramos “cráteres” lo que va en relación con la mayor reproducibilidad obtenida con las medidas electroquímicas. Sin embargo, al someter al electrodo a una temperatura mayor se encuentran acumulaciones de carbono en forma de lascas generando así zonas con “crestas”. Junto con los datos electroquímicos obtenidos para estos electrodos, podemos teorizar que al tener dos capas se obtiene una gran reproducibilidad, pero por el contrario al generar estas “crestas” por el efecto de la elevada temperatura, se generan otro tipo de irregularidades en la superficie. Esto puede conllevar a una menor cantidad de carbono depositada en el electrodo, dando lugar a señales electroquímicas menores que las obtenidas con los electrodos curados a 60°C durante la noche.

3) 60°C dos capas, curado durante la noche:

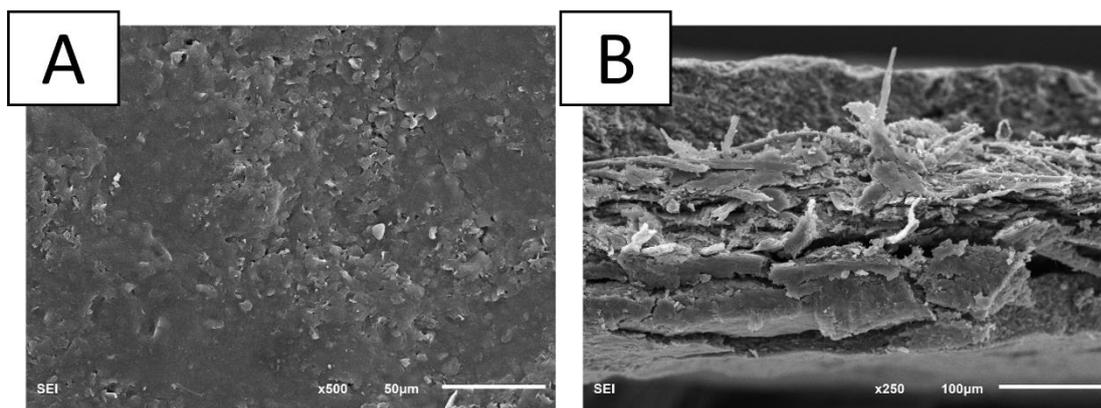


Figura 20: Imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM) correspondientes al electrodo de dos capas y curado a 60°C durante la noche: A. superficie del electrodo a 500 aumentos y B. interior del papel (corte transversal) a 250 aumentos.

Por último, se analizó el electrodo preparado bajo las condiciones que dieron lugar a una mejor respuesta electroquímica (figura 20). Observando las diferencias morfológicas con los anteriores electrodos se pueden obtener las siguientes conclusiones. La primera está ligada a la regularidad y homogeneidad de la superficie del electrodo. Como se aprecia en la figura 20A en este electrodo también se encuentran agrupaciones de carbono en formas de lascas, deduciendo así que esto es una característica de haber realizado dos capas. Sin embargo, a diferencia de los electrodos de 80°C no se encuentran crestas, sino que puede observarse una cierta regularidad a lo largo de la superficie. La segunda está relacionada con la figura 20B y es que, si se compara con los anteriores perfiles, es notorio que aquí sí que se encuentra una capa mucho mayor, ya que, analizando la imagen con detenimiento, se deduce que la parte central, al tener forma de filamentos, es considerada la zona de celulosa y la pared que observamos justo encima sería una pared uniforme de carbono. Además, se realizó un análisis por espectroscopía Rayos X dispersiva en energía (EDX) en dos zonas del perfil, como se observa en la figura 21. Se puede observar, que en la parte central encontramos calcio (figura 21C), indicativo que está presente la celulosa, mientras que en la parte inferior del electrodo (figura 21B), dicho indicativo ya no está presente y por lo tanto se entiende que prácticamente todo está cubierto de carbono.

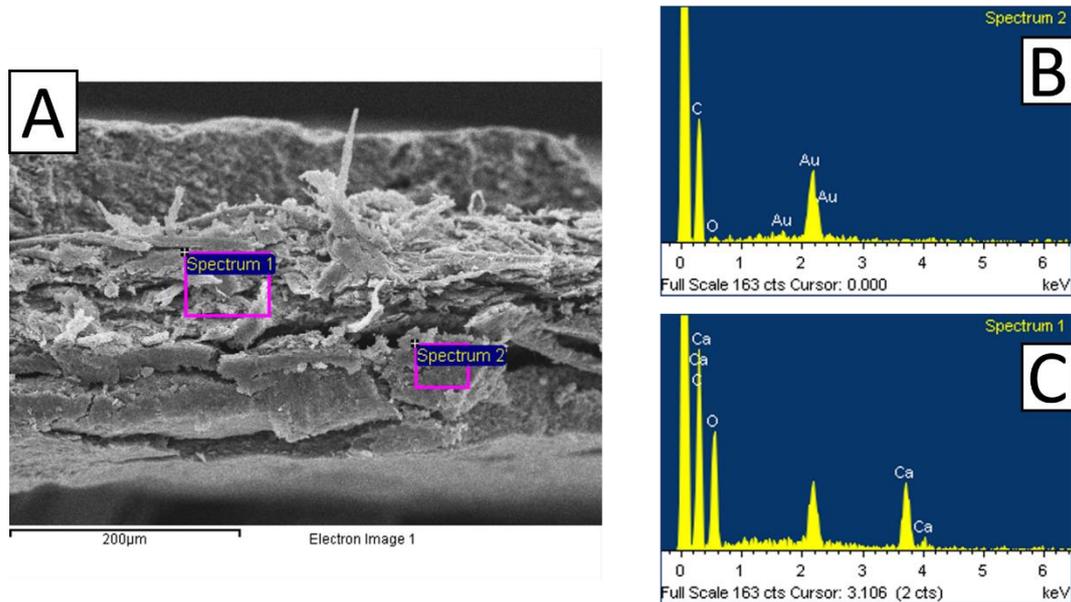


Figura 21: Imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM) correspondientes al electrodo de dos capas y curado a 60°C durante la noche: A. interior del electrodo (corte transversal). Espectros de Rayos X dispersiva en energía (EDX) para B. la zona 1 y C. la zona 2, señalados en A.

4.3. Estudio del coste de un electrodo

Teniendo en cuenta el coste de los materiales y reactivos necesarios para la fabricación de los electrodos, se realizó una estimación del coste unitario por electrodo, tal y como se muestra en la tabla 3

Tabla 3: Informe del coste unitario de los electrodos

MATERIALES	CANTIDAD 1 ELECTRODO	PRECIO MATERIAL	PRECIO FINAL
Papel de oficina	0.8% de una hoja	3.55 €/500 hojas	-----
Tinta SRCE-001	0.25 g	55 € / kg	0.013 €
DMF	0.55 ml	61 € / L	0.032 €
		TOTAL	0.045 €

El coste de fabricación de un electrodo es de 4.5 céntimos de euro. Es sin lugar a duda un proceso altamente rentable, ya que abaratando tanto esta parte del proceso de fabricación de un biosensor se gana una ventaja competitiva respecto al resto de fabricantes muy grande.

4.4. Conclusiones

Tras la finalización del trabajo, las principales conclusiones son las siguientes:

- Se ha conseguido la fabricación de electrodos de carbono, utilizando papel de oficina como soporte, sin necesidad de técnicas de impresión por serigrafía.
- La caracterización electroquímica de los electrodos, preparados bajo diferentes condiciones, ha permitido obtener que la deposición de carbono en dos etapas, y el secado/curado del mismo a 60°C durante la noche, da lugar a electrodos funcionales. La caracterización morfológica por microscopía electrónica corrobora los resultados electroquímicos.
- La porosidad de la celulosa, y la consiguiente distribución tridimensional de la tinta de carbono, ha permitido obtener electrodos con un área efectiva muy elevada (75% del área real del electrodo) en comparación con los valores encontrados en la bibliografía para electrodos preparados sobre soportes plásticos o cerámicos.
- El bajo coste unitario de los electrodos fabricados (4.5 céntimos de euro), junto a la accesibilidad de los materiales, la biodegradabilidad del papel y el alto rendimiento electroquímico permiten proponerlos como una alternativa ventajosa a los electrodos convencionales.

Como trabajos futuros, se plantean los siguientes:

- Estudio de vías alternativas para la deposición del carbono (ej. pulverización) que permitan un ahorro de tinta, además de un mejor escalado de la fabricación.
- Estudio de la deposición de electrodos de referencia y auxiliar sobre el sustrato de papel, con el fin de obtener un electrodo altamente integrado.
- Evaluación de los electrodos como plataforma (bio)sensora, para la determinación de analitos de interés en diversos campos (clínico, medioambiental, alimentario, etc.)

5. Bibliografía

- [1] D.R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson “Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification” *Pure Appl. Chem* 71(12) (1999) 2333-2348
- [2] D. Thévenot, K. Toth, R. R. Durst, G. G. Wilson, D. Thevenot “Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification” *Biosens. Bioelectron.* 16(12) (2001) 121-131
- [3] L.C. Clark, C. Lyons “Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery” *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102(1) (1962) 29-45.
- [4] L. C. Clark JR, R. Wolf, D. Granger, Z. Taylor “Continuous Recording of Blood Oxygen Tensions by Polarography” *J. Appl Physiol.* (1953) 189-193
- [5] J. R. Windmiller, J. Wang “Wearable Electrochemical Sensor and Biosensors: A Review” *Electroanalysis* (2012)
- [6] J. N. Miller, J. C. Miller *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* (2010) ISBN 9780273730422 (Citado en la página 16 y 135)
- [7] J. Wang *Analytical Electrochemistry volumen 3* (2000) ISBN 0471282723
- [8] N. J. Ronkainen-Matsuno, J. H. Thomas, H. B. Halsall, W. R. Heineman “Electrochemical immunoassay moving into the fast lane” *TrAC-Trends Anal.Chem.*21(4) (2002) 213-225
- [9] J. Wang, B. Tian “Screen-printed stripping voltammetric/potentiometric electrodes for decentralized testing of trace lead” *Anal.Chem.* 64(15) (1992) 1706-1709
- [10] C. Parolo, M. Medina-Sánchez, H. Montón, A. de la Escosura-Muñiz, A. Merkoçi “Paper-Based Electrodes for Nanoparticle Detection” *Particle System Characterization.* (30) (2013) 662-666.
- [11] *Química electroanalítica. Fundamentos y aplicaciones* J.M. Pingarrón P. Sanchez Batanero. Sintesis S.A (1999) ISBN 8477386633
- [12] L.B. Pires, A. De la Escosura-Muñiz, M. Balsells, J.C. Zuaznabar-Gardona, A. Merkoçi “Production and printing of Graphene oxide foam ink for electrocatalytic applications” *Electrochemistry Communications.* (98) (2019) 6-9