

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



Memoria de Título

**Desarrollo de electrodos modificados con materiales híbridos
basados en grafeno y fósforo de níquel para la detección
electroquímica de peróxido de hidrógeno**

DIEGO IGNACIO CASTILLO GUERRA

Profesora Patrocinante : Soledad Bollo Dragnic
Profesora Directora : Soledad Bollo Dragnic

Santiago-Chile

Marzo 2022

Resumen

En este trabajo se evaluó la capacidad electrocatalítica de electrodos de carbono vítreo (GC), modificados mediante la técnica *drop casting* con distintas proporciones de Ni₂P/rGO, para la detección de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Estos electrodos fueron caracterizados no solo desde el punto de vista electroquímico, sino que también desde la concepción morfológica, topológica, superficial y de composición elemental. Esto último mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), EDX, así como también la determinación del ángulo de contacto, para el conocimiento del grado de interacción que posee la superficie de GC modificada frente al agua.

Los electrodos modificados con el material electrocerámico utilizando técnicas electroquímicas, con el fin de comparar, entre las distintas proporciones, el efecto en la velocidad de transferencia electrónica, haciendo uso de ferroceno-metanol como mediador redox, a través de Voltametría Cíclica (VC); y la capacidad de detección y cuantificación de la sensibilidad en la oxidación de H₂O₂ a potencial constante, a través de amperometrías.

Se desarrolló un método analítico para aquel sistema seleccionado en lo que respecta a la detección del H₂O₂. Dado las pruebas preliminares, el sistema que se escogió fue la proporción de Ni₂P/rGO 70/30, a un potencial de oxidación de 0,400 V. Así, mediante amperometría y con adiciones de analito 0,01 mM, se determinaron parámetros relevantes como la sensibilidad ($45,5 \pm 3,5 \mu\text{A/Mm}$),

rango de linealidad (0,01 – 0,1 mM), y límites de detección (2,37 μM) y cuantificación (7,2 μM). Además, se estudió el efecto y la respuesta en corriente de posible interferentes.

Tabla de contenidos

1. Introducción.....	1
2. Hipótesis y Objetivos de la Memoria de Título	13
2.1 Hipótesis.....	13
2.2 Objetivo General.....	13
2.3 Objetivos Específicos.....	13
3. Materiales y Métodos	14
3.1 Materiales	14
3.2 Métodos.....	15
4. Resultados y Discusión	24
5. Conclusiones.....	66
6. Referencias	68

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi mamá Marcela el eterno apoyo que me ha entregado en la vida, pero en particular en este momento tan especial que ha significado el proceso de la actividad final de titulación.

Mencionar el apoyo y cariño de mi hermana, Catalina, también Química Farmacéutica, que ha sido siempre una inspiración y un ejemplo para seguir.

Es necesario mencionar y destacar el apoyo del laboratorio CiPRex y del equipo que lo compone, quienes me recibieron con la mejor voluntad y disposición. Por lo mismo, debo mencionar a Martín y a los “Sebas” que con su buen ánimo hacían más dinámico el día. También, quiero agradecer a Rodrigo que siempre estuvo siempre dando los mejores consejos para este proceso. Por su lado, Tania Brito, quien me enseñó mucho respecto a los procedimientos prácticos en el laboratorio, aconsejando acerca de cómo preparar cada solución y técnicas previo a su uso.

Además, de toda la gente antes mencionada, debo agradecer a la Dra. Claudia Yañez, quien siempre con su buen ánimo y carácter ofreció toda la ayuda posible en lo que llegase a necesitar. Y por último, quiero agradecer a la Dra. Soledad Bollo, guía y patrocinadora de esta memoria. Fue quien me introdujo en el mundo de la electroquímica y sensores/biosensores, enseñándome cada paso teórico y práctico, respondiendo dudas, y con su conocimiento guiarme en cada paso, pero sobre todo en aquellos momentos cuando los resultados no eran los que yo

esperaba. Agradezco su infinita paciencia, y también por enseñarme la versatilidad, potencial y capacidad que un Químico Farmacéutico puede llegar a desarrollar.

Índice de Tablas

Tabla 1: composición de compositos estudiados.	9
Tabla 2: composición en masa de cada dispersión de compositos.	17
Tabla 3: valores de potenciales máximos de oxidación y reducción de ferroceno- metanol (por triplicado).	26
Tabla 4: Parámetros analíticos de electrodos de carbono vítreo Ni ₂ P/rGO 70/30%.	34
Tabla 5: Parámetros analíticos de electrodos de carbono vítreo Ni ₂ P/rGO 70/30%; adiciones de de H ₂ O ₂ 0,01 mM.	36
Tabla 6: pérdida de señal post-adición de de H ₂ O ₂ 0,01 mM.	39
Tabla 7: parámetros analíticos comparativos de electrodo modificados con una dispersión Ni ₂ P/rGO 70/30% antes y después de dos semanas desde su preparación.	40
Tabla 8: orden y tiempos de adición de analito y glucosa.	44
Tabla 9: medio de disolución de nafion comercial (5%).	46
Tabla 10: Parámetros Analíticos Obtenidos de Electrodos Modificados con Ni ₂ P/rGO y post-adición de Nafion 0,5%.	48
Tabla 11: medios de dispersión para modificación de electrodos de carbono vítreo con Ni ₂ P/rGO y nafion al 0.5%.	51
Tabla 12: valores obtenidos de los ángulos de contacto y su clasificación.	58
Tabla 13: Resumen composicional del espectro de EDX, a partir de la superficie de GC modificada con Ni ₂ P/rGO 70/30%.	64

Índice de Figuras

Figura 1. Componentes de un biosensor [4].	3
Figura 2. Mecanismo de acción de los biosensores indirectos de glucosa, mediante electrocatálisis de peróxido de hidrógeno [7].	4
Figura 3. Amperogramas de electrodos modificados con Ni ₂ P y distintos materiales carbonáceos. pH 12 + NaCl 0,1 M.	10
Figura 4. Sensibilidades obtenidas a partir de la electrocatálisis de H ₂ O ₂ , para electrodos modificados con Ni ₂ P y distintos materiales carbonáceos.....	11
Figura 5. Voltamogramas cíclicos comparativos de una solución ferroceno - metanol 1 mM, utilizando electrodos de GC sin modificar (negro), modificados con rGO (rojo), y modificados con las distintas proporciones de Ni ₂ P/rGO, 30/70% (azul), 40/60% (rosado), 50/50% (verde), 60/30% (morado) y 70/30% (celeste). PBS pH 7.0.	25
Figura 6. Amperogramas comparativos de la electrocatálisis de H ₂ O ₂ , utilizando electrodos de GC modificados con Ni ₂ P/rGO a potenciales de 0,200 V (negro), 0,300 V (rojo), 0,400 V (azul), 0,500 V (rosado) y 0,600 V (verde). A. 30/70% B. 40/60% C. 50/50% D. 60/40% E. 70/30%.	28
Figura 7. Voltametría hidrodinámica de electrodos de GC modificados con distintas dispersiones de Ni ₂ P/rGO en el rango de proporciones 30/70 - 70/30%.	29

Figura 8. Amperometrías de electrodos de GC modificados con Ni ₂ P/rGO 70/30%. Adiciones de H ₂ O ₂ 0,1 mM a un potencial de trabajo 0,400 V. pH 12 + NaCl 0,1 M.....	32
Figura 9. Relación corriente vs concentración de electrodos de GC modificados con Ni ₂ P/rGO 70/30%. Adiciones de H ₂ O ₂ 0,1 mM a un potencial de trabajo de 0,400 V. pH 12 + NaCl 0,1 M.....	33
Figura 10. Amperometrías de electrodos de GC modificados con Ni ₂ P/rGO 70/30%. Adiciones de H ₂ O ₂ 0,01 mM a un potencial de trabajo 0,400 V. pH 12 + NaCl 0,1 M.....	35
Figura 11. Amperometrías de electrodos de GC modificados con Ni ₂ P/rGO 70/30%. Adiciones de H ₂ O ₂ 0,001 mM a un potencial de trabajo 0,400 V. pH 12 + NaCl 0,1 M.....	37
Figura 12. Pérdida de la señal post-adición de H ₂ O ₂ 0,05 mM.	38
Figura 13. Amperometrías de posibles interferentes 0,05 mM a 0,400 V.	43
Figura 14. Amperometrías de H ₂ O ₂ y glucosa a diferentes concentraciones... ..	44
Figura 15. Amperometrías de 0,01 mM con electrodo de GC modificados con Ni ₂ P/rGO 70/30% y nafion 0,5%.	47
Figura 16. Amperometrías interferentes equimolares con electrodos de GC modificados con Ni ₂ P/rGO 70/30% y nafion 0,5%.	49
Figura 17. Amperometrías comparativas de interferentes con electrodos de GC modificados Ni ₂ P/rGO 70/30% y nafion en distintas concentraciones.	50

Figura 18. Representación esquemática del ángulo de contacto, en distintos tipos de superficies.	54
Figura 19. Clasificación del grado de interacción de la superficie con el agua en función al ángulo de contacto medido.....	55
Figura 20. Imágenes obtenidas a partir de la determinación del ángulo de contacto sobre discos de GC modificados con Ni ₂ P/rGO en el rango de proporción 30/70 - 70/30%.....	57
Figura 21. Imágenes obtenidas a través de SEM de discos de GC modificados con las distintas proporciones de compositos Ni ₂ P/rGO. A. 70/30% B. 60/40% C. 50/50% D. 40/60% E. 30/70%.....	60
Figura 22. Imágenes SEM y EDX de discos de GC. A. Imagen SEM de modificación con Ni ₂ P/rGO 70/30%. B. distribución de carbono C. distribución de níquel D. distribución de fósforo.....	62
Figura 23. Espectro obtenido mediante EDX de la superficie del disco de GC modificado con Ni ₂ P/rGO 70/30%.....	64

Lista de abreviauras

- CoP: Fosfuro de cobalto
- EDX: Energía dispersiva de rayos X
- FAD: Flavina adenina dinucleótido
- FC: Fibras de carbono
- GC: Carbono Vítreo
- GDH: Glucosa deshidrogenasa
- GOx: Glucosa oxidasa
- HER: Reacciones de evolución de hidrógeno
- H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
- NaCl: Cloruro de sodio
- NaOH: Hidróxido de sodio
- Ni₂P: Fosfuro de níquel
- NTC: Nanotubos de carbono
- ORR: Reacciones de reducción de oxígeno
- PBS: Buffer fosfato
- PQQ: Pirroquinolona quinona
- rGO: óxido de grafeno reducido
- SEM: Microscopia electrónica de barrido
- TMP: Fosfuros de Metales de Transición
- VC: Voltametría cíclica

1. Introducción

La diabetes mellitus corresponde al trastorno metabólico asociado a presentar alteraciones en la regulación endocrina del organismo frente a los carbohidratos. Se caracteriza por presentar hiperglicemias de manera crónica, siendo resultado en un defecto de la secreción de insulina, en su acción o ambas [1]. Es una enfermedad de alta relevancia clínica dada su prevalencia, morbilidad y mortalidad, pues según datos de la OMS a nivel mundial 422 millones de personas viven con diabetes, en conjunto a que cada año se registran 1,6 billones de muertes atribuidas a la misma [2]. Por lo anterior, es importante que cada paciente diagnosticado con diabetes (sea tipo 1 o 2) se encuentre bajo un adecuado tratamiento, para así reducir el riesgo de las complicaciones asociadas a este trastorno, en donde destacan las microvasculares como las retinopatías, nefropatías y neuropatías [3].

Dada la importancia de conocer los valores de glicemia diarios, a nivel de mercado se pueden encontrar biosensores con capacidad de detección y cuantificación de glucosa en una muestra sanguínea.

En términos generales un sensor registra un estímulo, ya sea físico o químico convirtiéndolo en una respuesta de utilidad. Estos pueden clasificarse según el analito o el parámetro de detección, encontrando sensores físicos, referidos a aquellos sensores que miden parámetros tales como temperatura, presión, campo magnético, absorbancia, conductividad, cambio de masas entre otros,

destacando que no existe una superficie química activa. Por otra parte, se encuentran los sensores químicos, caracterizados por poseer una superficie química selectiva para un analito o familia de este. Al entrar en contacto el analito con la superficie química, dicha interacción genera una señal analítica medible, por ejemplo cambio de conductancia, luz, voltaje corriente e incluso sonido [4].

La incorporación de un componente biológico a un sensor, entendiendo este como un elemento de reconocimiento, permite el desarrollo de un biosensor. Dentro de estos elementos se describen enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, aptámeros e incluso células. Estos son inmovilizados por diferentes técnicas según el tipo de estructura que se utilice, logrando desarrollar un sistema de detección de alta selectividad y afinidad [4].

Por lo tanto, un biosensor se define como un “dispositivo analítico con capacidad de convertir una respuesta biológica en una señal cuantificable” [5], componiéndose de los siguientes elementos: bioreceptor o elemento de reconocimiento, transductor y sistema de procesamiento de información, tal y como lo muestra la Figura 1.

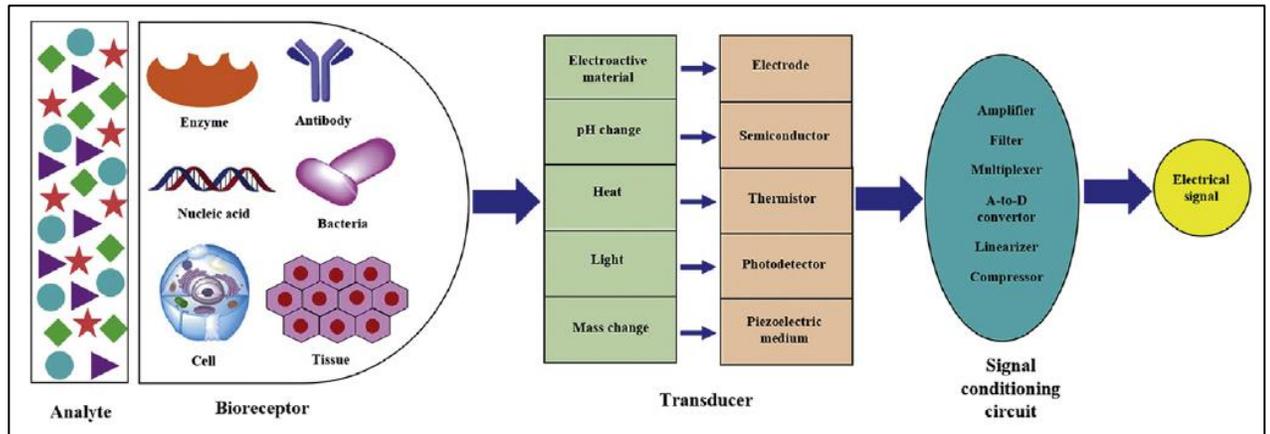


Figura 1. Componentes de un biosensor [4].

El método analítico que utilizan los biosensores para la detección de glucosa ha sido motivo permanente de investigación, con el fin de encontrar aquel método que logre los mejores parámetros de detección, como la sensibilidad y la selectividad, por mencionar algunos. Ya en el año 1967, Clark y Lyons desarrollaron el primer sistema de cuantificación de glucosa, mediante la formación de peróxido de hidrógeno a partir de oxígeno, dada la acción ejercida por la glucosa oxidasa, conformando un sistema enzimático clasificado como de primera generación [6].

Es así, que existen distintas técnicas descritas a nivel de literatura, en donde la detección de glucosa mediante biosensores electroquímicos es la que mayor desarrollo ha tenido esta última década. Siguiendo esta línea, dichas técnicas pueden ser clasificadas en enzimáticas y no enzimáticas [7], referido a si el método seleccionado hace uso o no de “enzimas redox”, es decir enzimas con capacidad de catalizar reacciones químicas que generan o consumen electrones, que para el caso de la cuantificación de la glucosa están referidas a la glucosa

oxidasa (GOx) y la glucosa deshidrogenasa (GDH) [5]. Estas enzimas a su vez requieren de cofactores, los cuales dan sustento a la reacción dada su capacidad de actuar como donores y aceptores de electrones. Dentro de estos se pueden mencionar la flavina adenina dinucleótido (FAD) y la pirroquinolona quinona (PQQ), quienes se encuentran estrechamente unidos a la enzima, tal y como muestra la Figura 2 [7].

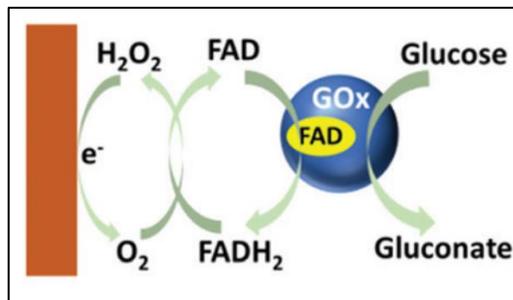


Figura 2. Mecanismo de acción de los biosensores indirectos de glucosa, mediante electrocatálisis de peróxido de hidrógeno [7].

Sea el método enzimático o no, al estar basados en técnicas amperométricas [7] se busca lograr la generación de un flujo de electrones mediado por un electrodo. Para el caso de los métodos enzimáticos, la mayoría de ellos comparten la característica de que la cuantificación es indirecta, es decir, que el detector no cuantifica glucosa, sino que estos métodos implican la formación de un intermediario o biomarcador. En este caso el resultado de la reacción de oxidación de la glucosa a ácido glucónico, genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2), aunque pueden existir otros mediadores según el método y materiales reactivos utilizados. El peróxido de hidrógeno se forma a partir de la reducción del oxígeno molecular en presencia del cofactor enzimático en su forma reducida.

Posteriormente, es sometido a una electrocatálisis en la superficie de un electrodo, pudiendo ser oxidado dado el potencial aplicado, como lo demuestra la Figura 2 [7]. El resultado de la reacción redox a la cual es sometido el peróxido permite cuantificar la concentración de glucosa en la muestra, pues esta es proporcional al flujo de electrones generado a partir de la oxidación del peróxido de hidrógeno [7, 8].

Es así, que el peróxido de hidrógeno se transforma en una molécula de interés para la cuantificación de glucosa y por lo tanto, es importante el desarrollo de métodos de detección de este biomarcador. El peróxido de hidrógeno puede ser cuantificado mediante distintas técnicas, siendo las electroquímicas, específicamente la amperometría la más simple y eficaz, además de ser sensible, selectiva y de bajo costo [9].

Diversos materiales han sido descritos y estudiados por tener actividad electrocatalítica no solo para lograr la cuantificación de glucosa (sea de forma directa o indirecta) o de otro analito de interés, sino que también en *reacciones de evolución de hidrógeno* (HER) y *reacciones de reducción de oxígeno* (ORR), ambos procesos asociados a la ruptura molecular del agua (Water Splitting) [10]. Estos materiales pueden ser clasificados en dos grandes grupos: el primero compuesto por metales nobles, dentro de los cuales se pueden encontrar al Pt, Ru, Rh, Au y Pd, que, si bien pueden presentar buenas propiedades de conductividad, son de alto costo y a la vez muy escasos. Por otra parte, en el segundo grupo se puede encontrar dos tipos de compuestos, siendo uno de ellos

los metales de transición, específicamente óxidos y calcógenos de dichos metales, los cuales siguen la fórmula MeX (donde Me puede ser Ni, Co, Cu; y X puede ser O, N, S, P o Se). El otro grupo de interés se encuentra conformado por compuestos derivados de carbono, como pueden ser el grafeno, nanotubos y nanofibras [11, 12].

Dado que los óxidos e hidróxidos de los metales de transición han demostrado tener una baja capacidad de conducción en comparación a los metales nobles, así como el alto costo de estos últimos, es que los selenuros, fosfuros y sulfuros de los metales de transición han llamado la atención desde el punto de vista electrocatalítico, debido a la evidencia que indica que estos tienen un buen grado de conductividad [13].

Los fosfuros de metales de transición (o del inglés *Transition Metal Phosphide* o su sigla *TMP*), se han convertido en los materiales con actividad electrocatalítica más prometedora, lo cual se debe a su buena conductividad y facilidad de fabricación, entre otras. Dentro de este grupo, el Ni₂P y el CoP han demostrado ser los más activos, dado que estudios han evidenciado los bajos potenciales a los cuales pueden trabajar, en conjunto con su aceptable durabilidad en los que respecta a su acción como agentes catalíticos en reacciones de evolución de hidrógeno, así como también en la electrocatálisis, y eventual detección de H₂O₂ [9, 11]. Por lo tanto, existe un interés en evaluar la actividad que estos compuestos pueden llegar a presentar frente a otros procesos catalíticos.

Además de los “TMPs”, el uso de materiales derivados de carbono han sido de interés en el uso y fabricación de biosensores, y también han sido utilizados en otros tipos de dispositivos, como pueden ser el desarrollo de electrodos de baterías de litio. Dentro de la variedad de formas que pueden adquirir los materiales derivados de carbono, el grafeno, entendiendo este como una lámina del ancho de un átomo, de estructura cristalina, cuyos átomos forman anillos hexagonales mediante enlaces sp^2 entre sí, han sido los más utilizados [14]. Este material ha sido usado como soporte para enzimas, además de poder mejorar su actividad catalítica mediante la adición de nanopartículas de metales nobles, potenciando la electrooxidación del peróxido de hidrógeno [15]. Otros materiales derivados de carbono, como son los filamentos de carbono, dentro de los cuales se incluyen los nanotubos y nanofibras, han sido de interés para el desarrollo no solo de electrodos, sino que también en la investigación y desarrollo de otras áreas como la conversión optoeléctrica, materiales de filtración, sistemas de almacenamiento de hidrógeno, sistemas de entrega de fármacos, entre otros. Así como las láminas de grafeno, estos filamentos también han sido modificados mediante la adición de nanopartículas de metales nobles, para el desarrollo de biosensores indirectos de glucosa, además las técnicas de fabricación pueden mejorar su capacidad de conductividad tanto térmica como eléctrica, así como también poder ser funcionalizados [13]. La funcionalización hace referencia a la adición de grupos funcionales a la superficie de un material, con el fin de alterar sus propiedades, como por ejemplo su hidrofiliidad o lipofiliidad [14].

Para lograr el desarrollo del biosensor y con el fin de mejorar la actividad electrocatalítica, la modificación de electrodos con materiales conductores ha permitido mejorar la capacidad del biosensor, especialmente cuando dicha modificación se realiza con nanomateriales [16].

Considerando las propiedades de los materiales antes mencionados, la fabricación de compositos o materiales compuestos, permite la obtención de nuevos materiales con propiedades cuyos precursores por sí solo no poseen, o bien no son suficientes. Dichos compositos posteriormente se utilizan como material de modificación de electrodos, lo cual se puede lograr mediante distintas técnicas, como *drop-casting*, *dip-coating*, *spin coating*, por mencionar algunas [16]. La modificación con nanocompositos permite potenciar propiedades electrocatalíticas del electrodo, dado la disminución de sitios de unión inespecíficos, aumento en la capacidad de transferencia de electrones y del área con capacidad electrocatalítica [16]. Por lo tanto, es de esperar que la combinación de los materiales derivados de carbono con metales de transición y sus respectivos óxidos, fosfuros, etc, dadas sus características funcionales, permita obtener un efecto sinérgico en la capacidad de realizar una medición electrocatalítica del peróxido de hidrógeno.

Este trabajo toma como precedente la investigación realizada por Constanza Venegas, en el marco del proyecto de investigación FONDECYT. En este se evaluó la modificación de electrodos de carbono vítreo con fosfuro de níquel en combinación con diversos materiales de carbono, mediante vía *ex situ*, utilizando

el método drop casting. Se compararon los parámetros analíticos obtenidos a partir de la oxidación de peróxido de hidrógeno.

En la Tabla 1 se muestran los materiales utilizados en el trabajo de Constanza Venegas y sus proporciones:

Tabla 1: composición de compositos estudiados.

Composito	Material inorgánico/cerámico	Compuesto derivado de carbono	Proporción (%)
1	Ni ₂ P	FC	70/30
2	Ni ₂ P	NTC	70/30
3	Ni ₂ P	rGO	70/30

Para las tres modificaciones se realizaron mediciones amperométricas, en donde se compararon los resultados obtenidos de la electrocatálisis del peróxido de hidrogeno, a través de electrodos modificados con los materiales en combinación según las proporciones indicadas en la Tabla 1, así como también de electrodos modificados con los materiales que conforman al composito por separado.

Para cada caso, se realizaron adiciones de analito de 0,1, 0,05 y 0,025 mM. Para cada sistema se estableció previamente el potencial de trabajo, los cuales fueron seleccionados de los respectivos voltamogramas hidrodinámicos, permitiendo la elección del sistema energético más eficiente.

En la Figura 3 se muestran los amperogramas obtenidos para cada tipo de electrodo modificado en el trabajo realizado por Constanza Venegas.

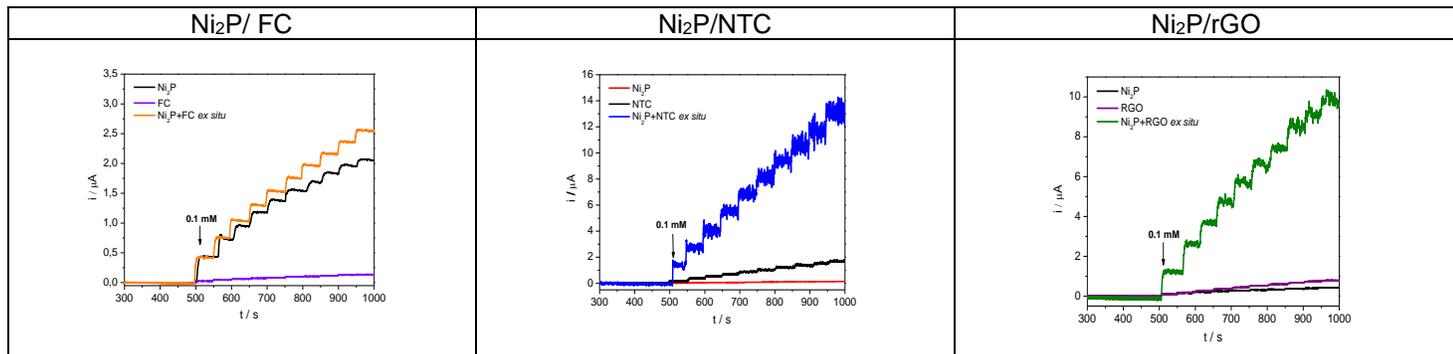


Figura 3. Amperogramas de electrodos modificados con Ni_2P y distintos materiales carbonáceos. pH 12 + NaCl 0,1 M.

De los amperogramas, se logra desprender que en todos los casos se obtuvo una mayor respuesta de corriente en aquellos electrodos modificados con los materiales en combinación. Por lo tanto, la mezcla *ex situ* de los materiales sí logra potenciar la capacidad electrocatalítica en la oxidación del peróxido de hidrógeno.

Siguiendo esta línea, en la Figura 4, se observan los valores de sensibilidad calculados mediante la técnica amperométrica para cada uno de los sistemas estudiados.

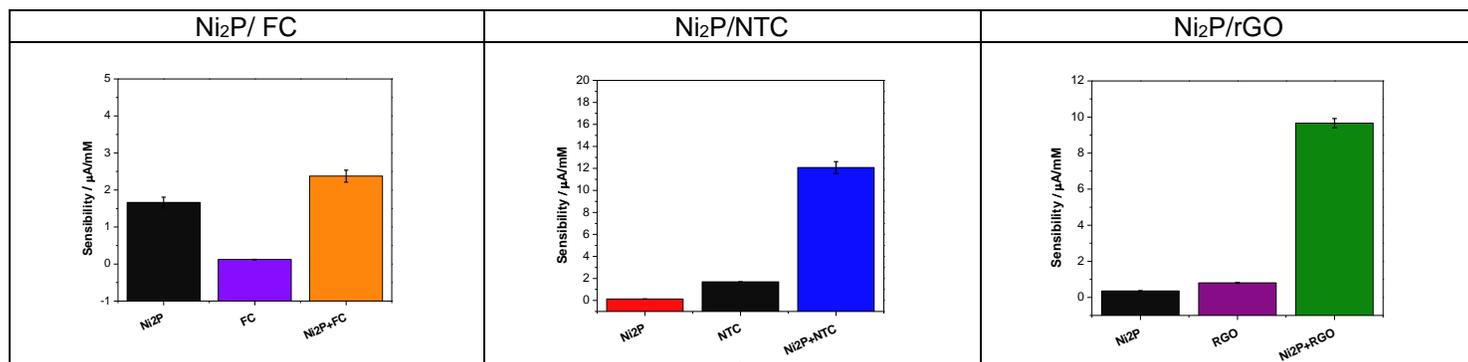


Figura 4. Sensibilidades obtenidas a partir de la electrocatálisis de H₂O₂, para electrodos modificados con Ni₂P y distintos materiales carbonáceos.

En todos los casos, la sensibilidad obtenida frente al peróxido de hidrógeno es mayor cuando el electrodo es modificado con la combinación de ambos materiales, lo cual se condice con lo observado en la Figura 3, en donde los valores de corriente generados eran mayores para aquellos electrodos modificados con el Ni₂P en conjunto con material derivado de carbono.

Lo que resulta interesante evaluar de la Figura 4 además del valor cuantitativo de la sensibilidad, es el grado de sinergia alcanzada por la mezcla de los materiales.

Así, los compositos Ni₂P/FC fueron los que menor sensibilidad mostraron, además se observó un bajo nivel de sinergia, puesto que la suma de las sensibilidades de los materiales es similar a la del material híbrido. Con respecto a las otras dos combinaciones, ambas obtuvieron sensibilidades similares, siendo levemente mayor para aquellos electrodos modificados con Ni₂P/NTC. Ahora bien, a pesar de esa diferencia en los valores de sensibilidad, los compositos

Ni₂P/rGO destacan por tener el mayor efecto sinérgico, dado los bajos valores de sensibilidad que poseen el Ni₂P y rGO por separado, y en consecuencia un bajo valor en la suma estimada, contrastado con el valor de sensibilidad de los materiales en combinación, el cual lo supera con creces.

En función a toda la información presentada, y luego de haber evaluado tres sistemas distintos con potencial de material para modificación de electrodo de carbono vítreo en la detección de peróxido de hidrógeno, se concluyó que las combinaciones de Ni₂P/NTC y Ni₂P/rGO mostraron un mejor grado de detección del analito, siendo estos comparables, referido a sus parámetros analíticos y mediciones amperométricas. Sin embargo, el sistema Ni₂P/rGO mostró un mejor efecto sinérgico al comparar las sensibilidades obtenidas.

En base a los datos preliminares presentados, en la presente memoria de título se propuso estudiar la modificación de electrodos de GC modificados con Ni₂P y rGO, vía *ex situ*, caracterizándolos desde el punto de vista superficial, composicional y topológico, así como también desde la perspectiva electroquímica, y su capacidad de detección y cuantificación del peróxido de hidrógeno.

2. Hipótesis y objetivos de la Memoria de Título

2.1 Hipótesis

La modificación de electrodos de carbono vitreo (GC) con compositos conformados de Ni₂P/rGO permitirá la formación de un sensor electroquímico capaz de detectar peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

2.2 Objetivo general

Estudiar la actividad electrocatalítica de compositos de fosfuro de níquel (Ni₂P) y óxido de grafeno reducido (rGO) frente a la oxidación de peróxido de hidrógeno.

2.3 Objetivos específicos

- Preparar y caracterizar electrodos de carbono vítreo modificados con compositos de diferentes proporciones de Ni₂P/rGO.
- Evaluar la respuesta electroanalítica de electrodos de carbono vítreo modificados con compositos de diferentes proporciones Ni₂P/rGO, para la oxidación de peróxido de hidrógeno.
- Desarrollar un método analítico utilizando la proporción de composito que haya dado la mejor respuesta en la detección de peróxido de hidrogeno.

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

➤ Reactivos y solventes

- Peróxido de hidrógeno 30% (Perhydrol®), Merck
- Ferroceno-metanol, Merck
- Óxido de grafeno reducido (rGO)
- Nafion (5%), Merck
- Cloruro de sodio, Merck
- Ácido ascórbico, Merck
- Ácido cítrico
- Di-sodio hidrogenofato (Na_2HPO_4), Merck
- Sodio di-hidrógeno fosfato monohidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$), Merck
- Glucosa monohidrato, Merck
- Sulfato de sodio, Merck
- Etanol técnico 75%, Merck
- Agua pureza Milli-Q (18 MΩcm)

➤ Equipos

- Potenciostato CHI650C (CH Instruments Electrochemical Workstation); goniómetro Ramé-hart (instrument co.).
- Microscopio de barrido electrónico: FE-SEM (Inspect F50, FEI) High Resolution Scanning Microscope modelo INSPECT-F50, Thermo Fisher Scientific (FEI, Holanda). Detectores: EDS, STEM, vCD, DBS y EDS (Ultradry Pathfinder Alpine 129 eV, Thermo Fisher Scientific).
- Celda electroquímica:
 - Celda de 10 mL
 - Electrodo de trabajo: carbono vítreo.
 - Electrodo de referencia: Ag/AgCl.
 - Electrodo auxiliar: alambre de platino (Pt).

3.2 Métodos

➤ Preparación de soluciones y reactivos

• Solución NaOH pH 12 + NaCl 0,1 M

El medio general de medición en las pruebas electroquímicas en la electrocatálisis de peróxido de hidrógeno es la celda con 5 mL, de una solución de NaOH pH 12 + NaCl 0,1 M.

Para su preparación se pesaron 0,4 g de NaOH y 5,8 g de cloruro de sodio, transferidos a un matraz de aforo de 1000 mL. Luego, se aforó con agua Milli-Q, sonicando la solución por 40 minutos o hasta total homogeneidad.

Posteriormente, mediante el uso del pH-metro se ajustó el pH de la solución a través de la adición de hidróxido de sodio concentrado.

- **Buffer fosfato 0,1 M pH 7 (PBS) + ferroceno-metanol 1 mM**

La solución PBS se preparó pesando 14,2 g de Na_2HPO_4 y 13,8 g NaH_2PO_4 , aforando con agua Milli-Q en un matraz volumétrico de 1000 mL. El pH fue posteriormente ajustado adicionando NaOH concentrado hasta alcanzar un valor de pH de 7,0. Luego, se pesó 2,16 mg de ferroceno-metanol, los cuales fueron transferidos a un matraz de 10 mL, el cual se aforó a dicho volumen con la solución PBS preparada.

- **Soluciones de peróxido de hidrógeno**

Las soluciones de peróxido para las mediciones amperométricas se prepararon cada día en que fuesen necesitadas, a partir de una solución stock de 9,07 M (previamente titulados). El volumen por adición para toda medición fue de 40 μL , por lo tanto se calculó una concentración tal que permita alcanzar concentraciones de 0,1 mM por cada alícuota añadida, considerando el volumen de 5 mL de la celda.

Por lo anterior, para la preparación de las soluciones de peróxido hidrógeno se tomó una alícuota de 34,7 μL de la solución stock, llevados a un matraz volumétrico ámbar de 25 mL. Este fue almacenado en el refrigerador y durante las mediciones, el peróxido de hidrógeno preparado se mantuvo en un recipiente con hielo molido.

- **Dispersiones Ni₂P/rGO**

Se prepararon dispersiones de Ni₂P/rGO en un rango de proporción de 30/70 a 70/30 en peso, a una concentración total de 2 mg/mL. El medio de dispersión de todas ellas consistió en una solución de 8 mL de agua Milli-Q, 2 mL de isopropanol y 40 µL de nafion al 5%.

Las cantidades pesadas para cada dispersión se encuentran descritas en la Tabla 2:

Tabla 2: composición en masa de cada dispersión de compositos.

Dispersión (Ni₂P/rGO)	Ni₂P (mg)	rGO (mg)
30/70	0,6	1,4
40/60	0,8	1,2
50/50	1,0	1,0
60/40	1,2	0,8
70/30	1,4	0,6

Cada componente de la dispersión se pesó directamente en un eppendorf con capacidad de 2 mL, posteriormente se añadió 1 mL de la solución dispersante. Finalmente, cada dispersión se sonicó por 1 hora, y en los días posteriores a su uso, se sonicó durante 20 – 25 minutos, hasta alcanzar el mayor grado de homogeneidad posible.

- **Modificación de electrodos de carbono vítreo**

Los electrodos de carbono vítreo o GC fueron modificados con las distintas dispersiones de proporciones previamente indicadas de los compositos

Ni₂P/rGO. El método de modificación es mediante drop casting, para lo cual se trabajó con el siguiente esquema de preparación:

1. Seleccionados los electrodos de trabajo a utilizar, estos se pulieron, lo que implicó disponer silicato de aluminio en polvo sobre dos placas petris cubiertas con fieltro, en una de ellas con tamaño de partícula de 0,3 μm y en la otra 0,05 μm . Posteriormente, se mojó con suficiente agua Milli-Q formando una pasta.
2. Con la pasta formada, se procedió al pulido, para lo cual cada electrodo se lava con agua Milli-Q, y se seca con papel absorbente.
3. El electrodo seco fue pulido durante 25 segundos (cronometrados) sobre cada pasta, siendo primera la de mayor tamaño de partícula, y luego la de menor. La técnica de pulido consistió en dibujar un “ocho” durante el tiempo establecido, asegurando eliminar cualquier impureza que pudiese existir en la superficie, lavando con abundante agua después de cada pulido.
4. Luego de realizar el doble pulido, los electrodos se dejaron secar a temperatura ambiente.
5. Una vez pulidas las superficies de los electrodos se modificaron con las respectivas dispersiones según el objetivo de la medición, para lo cual se añadió una alícuota de 5 μL de la dispersión, y luego ser llevado a secado en la estufa a 50 °C durante 10 minutos. Una vez seco, se volvió a realizar el proceso una segunda vez sobre la superficie ya modificada.

➤ **Metodología de estudio electroquímico y caracterización de compositos.**

El trabajo realizado consistió en la evaluación y caracterización de compositos de Ni₂P/rGO, motivo por el cual fue dividido en tres grandes partes, las cuales son explicadas en los puntos descritos a continuación.

• **Caracterización superficial, composicional y topológica de los electrodos modificados con los compositos Ni₂P/rGO.**

La caracterización de los compositos se realizó por diversas técnicas. Para el conocimiento del grado de interacción de la superficie con el agua se midió el ángulo de contacto, para lo cual se simuló la modificación de los electrodos con discos de carbono vítreo.

Para el estudio de la morfología y topología de una superficie de carbono vítreo modificada con las diversas proporciones de compositos, se utilizó la Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) acoplado con el detector de energía dispersiva de rayos X (EDX), para la caracterización composicional elemental de la modificación.

- **Evaluación electrocatalítica de electrodos modificados con diferentes proporciones de Ni₂P/rGO frente a la oxidación de peróxido de hidrógeno.**

Los electrodos de carbono vítreo fueron modificados con distintas proporciones de Ni₂P/rGO, siendo estas de 30/70, 40/60, 50/50, 60/40, 70/30.

Cada dispersión fue trabajada bajo las mismas condiciones y de igual manera, siendo utilizadas técnicas amperométricas y voltamétricas para caracterizar los electrodos resultantes.

1. Voltametría cíclica: el medio de trabajo fue de 5 mL de solución ferrocenometanol 1 mM en PBS pH 7,0. El rango de potencial seleccionado fue de -0,200 a 0,800 V, a una velocidad de 0,1 V/s.

Todas las mediciones se realizaron por quintuplicado por cada proporción de composito, permitiendo así conocer el perfil electroquímico.

2. Amperometrías: el medio de trabajo fue de 5 mL de solución de NaOH pH 12 + NaCl 0,1 M. Cada medición requirió un tiempo de estabilización de por lo menos 500 segundos previo a la primera adición de analito. Constó de 10 adiciones de alícuotas de 40 µL, de concentración tal que permitió concentraciones finales de 0,1 mM/adición. Cada adición se realizó con cincuenta segundos de espera.

La metodología que se aplicó fue la de evaluar cada proporción de composito aplicando los siguientes potenciales de trabajo 0,200, 0,300,

0,400, 0,500 y 0,600 V. Todas las mediciones se realizaron por triplicado, esto es utilizando 3 electrodos modificados por proporción.

De los experimentos amperométricos se realizaron dos análisis:

- a. Se evaluó la corriente promedio obtenida durante la primera adición a los distintos potenciales seleccionados, y se construyó un voltamograma hidrodinámico, evaluándose el potencial de inicio de la electrocatálisis a cada proporción.
- b. Se analizó la corriente en función de la concentración de peróxido de hidrógeno determinándose la sensibilidad de la medición.

- **Desarrollo del método analítico.**

A través de los resultados obtenidos en el punto anterior, se seleccionó aquella dispersión y potencial de trabajo que logró la mejor actividad electrocatalítica de peróxido de hidrógeno.

1. Seleccionado dichos parámetros se procedió a determinar los parámetros analíticos obtenidos a través de mediciones amperométricas, siguiendo el mismo procedimiento antes expuesto. Los parámetros analíticos de interés a determinar fueron:
 - a. Rango de linealidad: se trabajaron con adiciones de 0,1 mM de peróxido de hidrógeno, realizando un total de 10. Este parámetro se determinó estableciendo hasta cual adición se observa

proporcionalidad de la respuesta en corriente, en relación a la concentración de peróxido de hidrógeno adicionada.

- b. Sensibilidad: a partir de los amperogramas, y mediante la aplicación del método de curva de calibración, se puede construir un gráfico de corriente vs concentración de analito, y realizando una regresión lineal se puede conocer el valor de la pendiente, según la siguiente ecuación

$$y = a + bx$$

Donde:

- a : Es el intercepto (unidad de corriente / μA)
 - b : Es la pendiente o la sensibilidad (relación corriente y concentración / $\mu\text{A}/\text{mM}$)
 - x : concentración de analito (mM)
- c. Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ): para el cálculo de estos parámetros se aplicaron las siguientes fórmulas.

$$LOD = 3,3 * \frac{\bar{\Delta}i}{S}$$

$$LOQ = 10 * \frac{\bar{\Delta}i}{S}$$

Donde:

- S : Es la pendiente obtenida de cada medición amperométrica.
- $\bar{\Delta}i$: Es la desviación estándar del promedio de las diferencias de los valores de corriente máxima y mínima de los amperogramas, previo a la adición del analito (ruido).

Sus unidades son de concentración (mM y μ M).

2. Se procedió a determinar los mismos parámetros analíticos, con la diferencia en que las adiciones de analito fueron 10 y 100 veces más diluidas con respecto a lo ya trabajado. De esta manera se logró conocer hasta qué valores de concentración se logra la obtención de una respuesta electroquímica medible.
3. Para la evaluación de la reproducibilidad, se modificaron 10 electrodos de carbono vítreo con una dispersión de Ni₂P/rGO 70/30%, determinando mediante amperometría los parámetros analíticos antes descritos. La dispersión utilizada para la modificación se almacenó, y luego de dos semanas se repitió el procedimiento, comparando así los valores de los parámetros analíticos.
4. En función a lo referido en la literatura, se evaluó la capacidad de interferencia de múltiples sustancias a través de amperometrías, siendo estas:
 - a. Ácido ascórbico
 - b. Ácido úrico
 - c. Glucosa
 - d. Sulfato de sodio

4. Resultados y discusión

➤ **Estudio electroquímico de electrodos de carbono vítreo modificados con compositos de Ni₂P/rGO.**

• **Caracterización electroquímica mediante Voltametría Cíclica (VC).**

En la Figura 5 se observan los voltamogramas cíclicos de ferroceno-metanol obtenidos a partir de las VC realizadas a ferroceno-metanol 1 mM, obtenidos a partir de las diferentes proporciones de Ni₂P/rGO en el rango de 30/70% a 70/30%. Para fines comparativos se incluyeron electrodos de carbono vítreo no modificados (GC), y GC modificados con óxido de grafeno reducido a partir de una dispersión de concentración 1 mg/mL (GC/rGO),

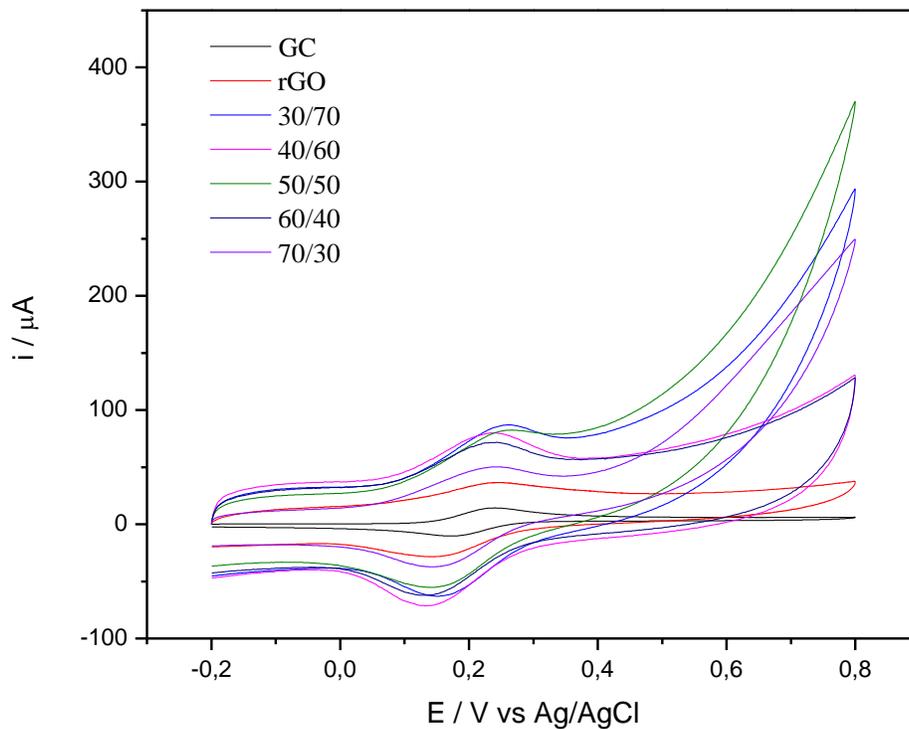


Figura 5. Voltamogramas cíclicos comparativos de una solución ferroceno - metanol 1 mM, utilizando electrodos de GC sin modificar (negro), modificados con rGO (rojo), y modificados con las distintas proporciones de Ni₂P/rGO, 30/70% (azul), 40/60% (rosado), 50/50% (verde), 60/30% (morado) y 70/30% (celeste). PBS pH 7.0.

Las VC fueron realizadas por triplicado con el fin de establecer el grado de reproducibilidad que cada electrodo posee en el sistema. En la siguiente tabla se pueden observar los valores promedios, de los potenciales picos de oxidación y reducción del ferroceno metanol, así como también el parámetro ΔE_p .

Tabla 3: valores de potenciales máximos de oxidación y reducción de ferroceno-metanol (por triplicado).

Parámetros	E_{Ox}		E_{Red}		ΔE_p (V)
	Promedio (V)	CV (%)	Promedio (V)	CV (%)	
GC	0,241 ± 0,003	1,4	0,172 ± 0,001	0,8	0,069
rGO	0,236 ± 0,004	1,7	0,140 ± 0,007	5,0	0,096
Ni₂P/rGO (30/70)	0,248 ± 0,010	4,3	0,149 ± 0,002	1,5	0,099
Ni₂P/rGO (40/60)	0,234 ± 0,007	3,0	0,135 ± 0,003	2,2	0,099
Ni₂P/rGO (50/50)	0,263 ± 0,004	1,7	0,140 ± 0,002	1,6	0,123
Ni₂P/rGO (60/40)	0,240 ± 0,005	2,3	0,136 ± 0,009	6,6	0,104
Ni₂P/rGO (70/30)	0,246 ± 0,010	4,1	0,143 ± 0,004	2,8	0,103

En función a los datos presentados en la Tabla 3, se puede observar un alto grado de reproducibilidad en las mediciones realizadas con cada uno de los sistemas, dado los bajos coeficientes de variación, menores al 5%.

Por otro lado, del análisis de los potenciales de oxidación, y de reducción del ferroceno-metanol, se pueden observar valores similares entre las distintas composiciones estudiadas y cercanos a los obtenidos al utilizar rGO solo como material electródico. Si se compara con los valores utilizados solo con el electrodo de GC, hay un aumento en el ΔE_p del proceso redox en cerca de 30 mV, indicando que las nuevas superficies enlentecen la transferencia electrónica de este proceso redox.

Ahora bien, el punto que marca la diferencia y que establece una variación relevante, son los valores de corriente alcanzados en los sistemas modificados, siendo estos mayores en el caso de los electrodos modificados con los compositos Ni₂P/rGO, en relación a los obtenidos con los electrodos sin modificar y aquellos que fueron modificados solo con rGO.

- **Evaluación amperométrica de los compositos.**

Por medio de mediciones amperométricas, fueron puestas a prueba las cinco proporciones de Ni₂P/rGO en la detección del peróxido de hidrógeno.

Así, cada electrodo utilizado fue evaluado a los potenciales de 0,200, 0,300, 0,400, 0,500 y 0,600 V, realizando mediciones por triplicado para cada potencial.

El objetivo principal de este estudio es establecer cuál es la proporción y potencial de trabajo que permitan mejores valores de corriente frente a similares adiciones de analito, así como también determinar cuál sistema alcanza una mayor reproducibilidad.

En la Figura 6 se observan los amperogramas representativos de cada potencial, para cada proporción de compositos.

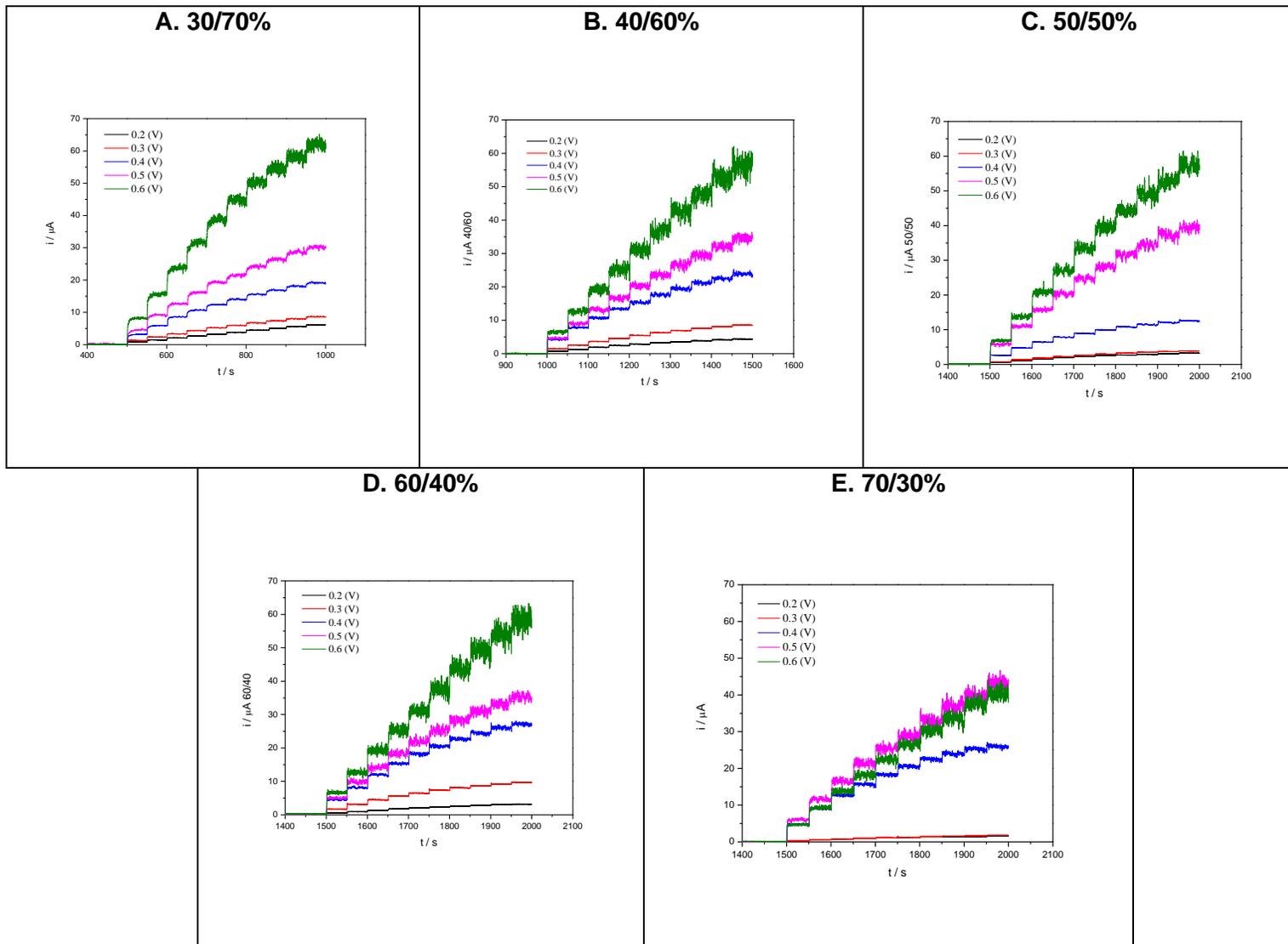


Figura 6. Amperogramas comparativos de la electrocatalisis de H_2O_2 , utilizando electrodos de GC modificados con $\text{Ni}_2\text{P}/\text{rGO}$ a potenciales de 0,200 V (negro), 0,300 V (rojo), 0,400 V (azul), 0,500 V (rosado) y 0,600 V (verde). **A.** 30/70% **B.** 40/60% **C.** 50/50% **D.** 60/40% **E.** 70/30%.

De forma general, se puede establecer que la pendiente de las curvas amperométricas son más altas, a medida que se utiliza un potencial de trabajo mayor, pero también es posible observar un aumento del ruido de la señal.

Obtenidos cada uno de los amperogramas a los distintos potenciales, se construye el voltamograma hidrodinámico utilizando los valores de corriente, obtenidos luego de la primera adición de peróxido de hidrógeno 0,1 mM.

En la Figura 7 se observan las voltametrías hidrodinámicas para cada una de las proporciones utilizadas.

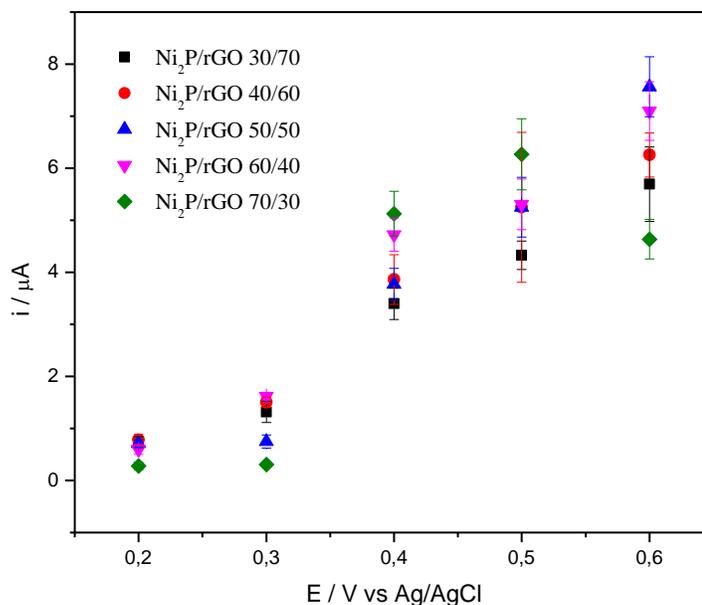


Figura 7. Voltametría hidrodinámica de electrodos de GC modificados con distintas dispersiones de Ni₂P/rGO en el rango de proporciones 30/70 - 70/30%.

Al analizar las voltametrías hidrodinámicas, se visibiliza que los valores de corrientes alcanzados con la adición de peróxido aumentan, a medida que se aumenta el potencial de trabajo del sistema. Es así, que el potencial de trabajo ideal sería aquel de más alto valor, dado que genera mayor respuesta en corriente, pero se debe tener en consideración que el uso de potenciales más altos puede generar respuesta de otras moléculas que actúen como eventuales interferentes, motivo por el cual se debe seleccionar un potencial que permita la mejor respuesta de electroquímica al menor potencial posible. Sumado a esto, también es importante considerar en la selección del mejor sistema, aquel que tenga un menor grado de dispersión de datos, de forma tal que la respuesta frente al analito sea lo más reproducible posible.

Al realizar el análisis del grado de variabilidad de la respuesta, se puede establecer que en todas las proporciones de compositos trabajadas, la desviación estándar es menor a potenciales de trabajo más bajos, particularmente a 0,200 y 0,300 V, pero a su vez, a estos potenciales los valores de corriente son muy bajos en comparación a los otros. Por otro lado, los valores desviación estándar aumentan a potenciales mayores, pero, se obtiene el beneficio de alcanzar una respuesta mayor en corriente. Considerando lo anterior, los valores de desviación son particularmente menores para la proporción de Ni₂P/rGO 70/30%. Además, la misma dispersión de compositos a los potenciales 0,400 y 0,500 V alcanza los mayores valores de corriente. Así, con el objetivo de desarrollar un sistema más eficiente en términos energéticos, se escoge el potencial de 0,400 V.

Por lo tanto, el sistema seleccionado como idóneo para desarrollar un método electroanalítico para la detección de peróxido de hidrogeno es la proporción de compositos de Ni₂P/rGO 70/30%, con un potencial de trabajo de 0,400 V, dado el buen nivel de corriente alcanzado, así como por su grado de reproducibilidad.

➤ **Determinación de parámetros analíticos de electrodos modificados con compositos Ni₂P/rGO 70/30%.**

Para la determinación de los parámetros analíticos del sensor bajo las condiciones seleccionadas a través de técnicas amperométricas, se trabajó en condiciones similares a las del punto anterior, es decir, 10 adiciones de peróxido de hidrogeno 0,1 mM, separadas cada una por un tiempo de 50 segundos, realizando la primera adición luego de alcanzar una estabilización de la señal amperométrica.

Los parámetros analíticos determinados son el rango lineal, límite de cuantificación, límite de detección y la sensibilidad. Para esto, se debe realiza un total de 10 mediciones amperométricas, utilizando un electrodo diferente cada vez.

En la Figura 8, se puede observar el conjunto de 10 amperogramas realizados, los cuales fueron analizados graficándose la correspondiente relación corriente vs concentración, según muestra la Figura 9.

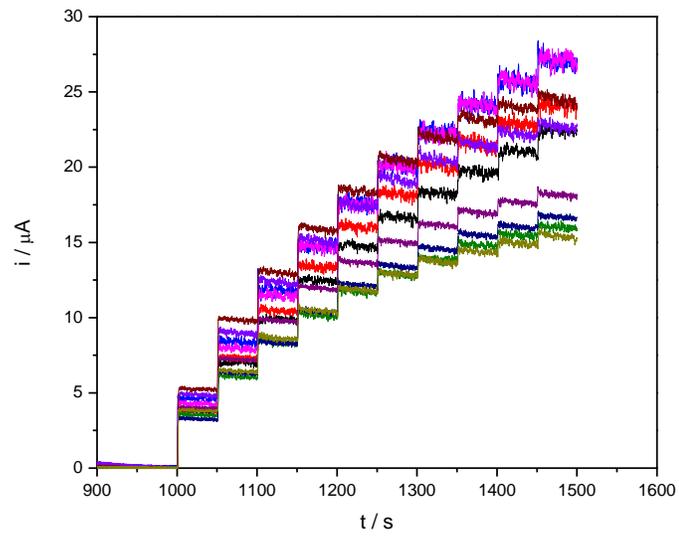


Figura 8. Amperometrías de electrodos de GC modificados con $\text{Ni}_2\text{P}/\text{rGO}$ 70/30%. Adiciones de H_2O_2 0,1 mM a un potencial de trabajo 0,400 V. pH 12 + NaCl 0,1 M.

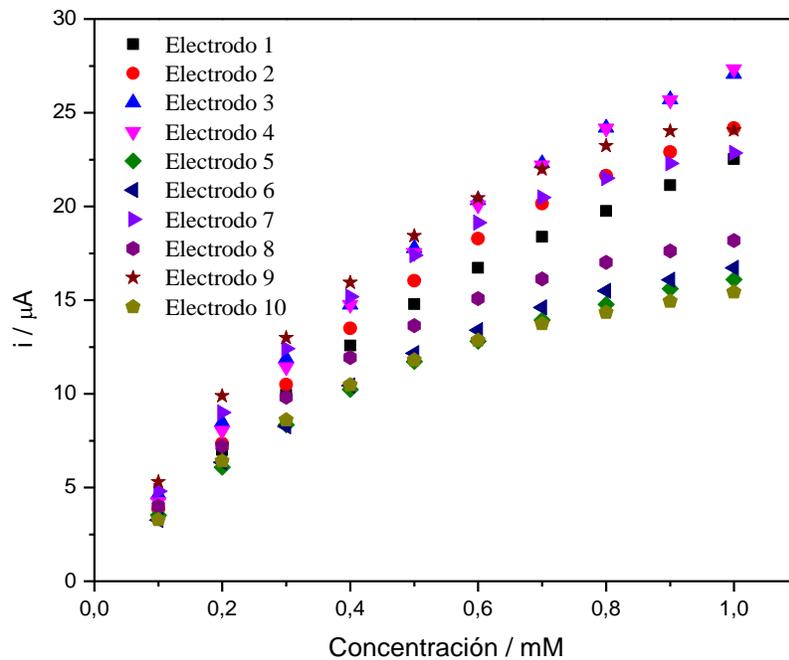


Figura 9. Relación corriente vs concentración de electrodos de GC modificados con Ni₂P/rGO 70/30%. Adiciones de H₂O₂ 0,1 mM a un potencial de trabajo de 0,400 V. pH 12 + NaCl 0,1 M.

A partir del gráfico de la Figura 9, se establece como rango lineal los valores de concentración de 0,1 a 0,6 mM. De cada curva, se obtuvo el valor de cada pendiente, calculando el valor promedio, así como los límites de detección y de cuantificación.

Es así, que en la Tabla 4 se encuentran descritos los parámetros analíticos obtenidos a partir de las 10 amperometrías realizadas.

Tabla 4: Parámetros analíticos de electrodos de carbono vítreo Ni₂P/rGO 70/30%.

Parámetro	Electrodo GC/Ni ₂ P/rGO (<i>Ex situ</i>)
Rango lineal (mM)	0,1 – 0,6
Sensibilidad (μA/mM)	25,4 ± 5,3
LOD (μM)	3,5
LOQ (μM)	10,7

Se puede observar que el rango de linealidad utilizado para los cálculos analíticos no abarcó todo el rango de concentración estudiado (0,1 – 1,0 mM). Por lo tanto, en función a los valores de linealidad obtenidos, se procedió a conocer hasta qué valor de concentración de peróxido de hidrógeno se puede disminuir, permitiendo la obtención de una respuesta electroquímica visible. Para esto, se realizó mediciones amperométricas con adiciones de peróxido de hidrógeno 10 y 100 veces diluidas, es decir, adiciones de 0,01 mM y 0,001 mM.

Al realizar amperometrías con adiciones de analito diluidas de 0,01 mM se obtuvo las curvas amperométricas que se muestran en la Figura 10.

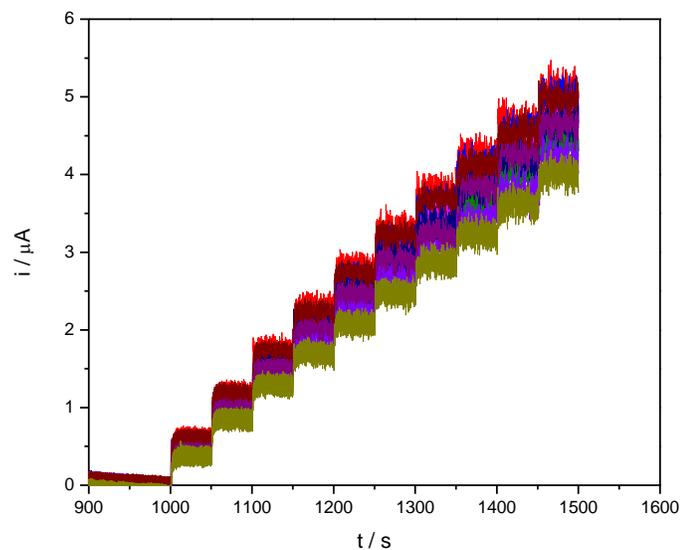


Figura 10. Amperometrías de electrodos de GC modificados con Ni₂P/rGO 70/30%. Adiciones de H₂O₂ 0,01 mM a un potencial de trabajo 0,400 V. pH 12 + NaCl 0,1 M.

De igual forma a lo anterior, se realizaron 10 mediciones amperométricas, a través de las cuales se aplicó el método de curva de calibración para obtener la sensibilidad, siendo reportado el valor promedio de sensibilidad de las regresiones lineales obtenidas por cada amperometría.

En la Tabla 5 se reportan los parámetros analíticos obtenidos a partir de las mediciones con adiciones de 0,01 mM.

Tabla 5: Parámetros analíticos de electrodos de carbono vítreo Ni₂P/rGO 70/30%; adiciones de de H₂O₂ 0,01 mM.

Parámetro	Electrodo GC/Ni ₂ P/rGO (<i>Ex situ</i>)
Rango lineal (mM)	0,01 – 0,1
Sensibilidad (μA/mM)	45,5 ± 3,5
LOD (μM)	2,37
LOQ (μM)	7,20

A diferencia de las adiciones más concentradas, en este caso se obtuvo una respuesta amperométrica cuyo rango de linealidad abarcó las 10 adiciones de analito realizadas.

Por otra parte, al realizar las amperometrías con adiciones de peróxido de hidrógeno 0,001 mM, de hidrógeno, no se alcanzó a pesquisar una señal estable, dado el grado de dilución alcanzado.

En la Figura 11 se pueden observar un conjunto de 4 amperometrías realizadas, en donde se aprecia los bajos niveles de corriente alcanzados por adición de alícuota de analito, así como también la rápida pérdida de la señal.

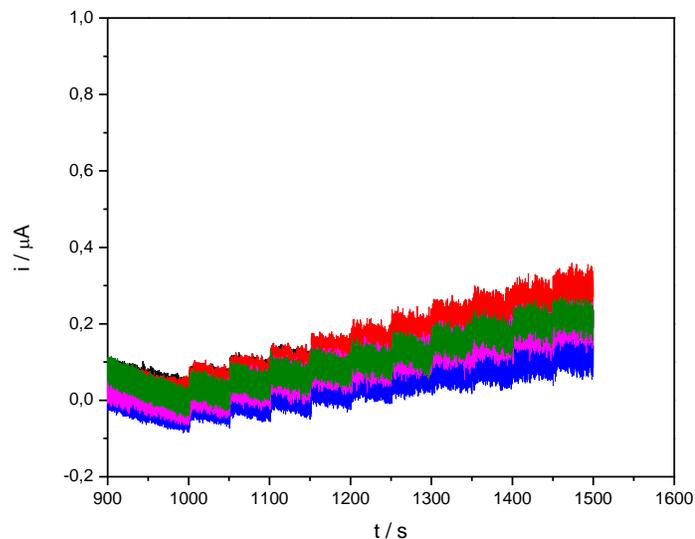


Figura 11. Amperometrías de electrodos de GC modificados con Ni₂P/rGO 70/30%. Adiciones de H₂O₂ 0,001 mM a un potencial de trabajo 0,400 V. pH 12 + NaCl 0,1 M.

En los amperogramas anteriores, se puede observar que cada salto de corriente dado la adición de peróxido de hidrógeno es ínfimo, en conjunto a que la señal generada no es sostenida, cuya señal disminuye notoriamente durante el periodo de estabilización de 50 segundo post-adición.

Dado el rango de linealidad, las próximas amperometrías realizadas con el fin de detectar peróxido de hidrógeno se basaron en adiciones de 0,01 mM.

Otro parámetro que se buscó determinar es la pérdida de señal luego de una adición de alícuota. La concentración definida para esta alícuota se seleccionó en función a la generación de una respuesta de corriente relevante, y que a la

vez se encontrara dentro del rango de linealidad establecido previamente, a través de las adiciones de 0,01 mM.

En el gráfico de la Figura 12 aparecen cinco amperogramas, en los cuales se adicionó una sola alícuota de analito alcanzando una concentración de 0,05 mM, valor de concentración que se encuentra dentro del rango de linealidad establecido. Posterior a la adición, se dejó correr el amperograma durante 1200 segundos. Para establecer la pérdida de señal, se evaluó el valor de corriente inicial y se calculó el delta porcentual con respecto al valor de corriente luego de los 1200 segundos transcurridos después adición.

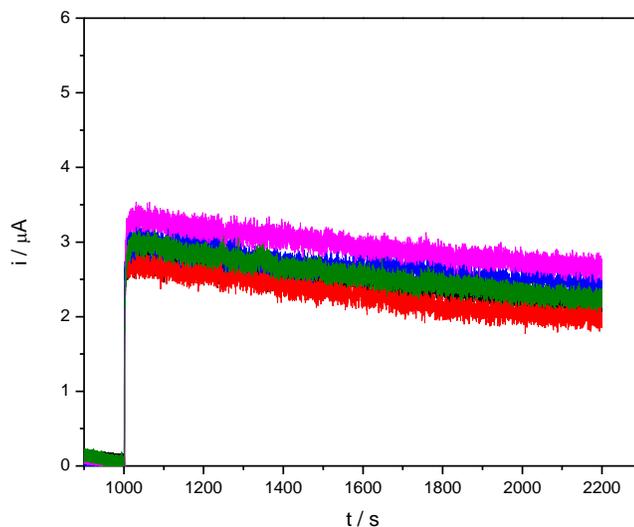


Figura 12. Pérdida de la señal post-adición de H₂O₂ 0,05 mM.

En función a los amperogramas vistos, se obtuvieron los siguientes valores porcentuales de pérdida de señal, según indica la Tabla 6

Tabla 6: pérdida de señal post-adición de de H₂O₂ 0,01 mM.

Electrodo	Corriente (Seg = 1000) (μA)	Corriente (Seg = 2200) (μA)	Δ Porcentual de corriente (%)
1	2,8	2,1	22,5
2	2,7	1,9	26,2
3	3,0	2,4	20,5
4	3,3	2,7	18,9
5	2,9	2,2	24,6

Por lo tanto, la pérdida promedio de la señal luego de 1200 s post adición fue de **22,5 ± 2,9 %**.

- **Determinación de la reproducibilidad de la dispersión.**

Para la evaluación del grado de reproducibilidad se preparó una dispersión Ni₂P/rGO 70/30. Con esta dispersión se modificaron electrodos de GC, realizando 10 mediciones amperométricas con el fin de establecer los parámetros analíticos obtenidos a partir de ellos.

Dicha dispersión se almacenó durante 2 semanas, para luego repetir el procedimiento antes descrito, y así poder comparar los parámetros analíticos obtenido posterior al transcurso de ese periodo.

Para ambos casos se realizaron 10 mediciones amperométricas, a partir de las cuales se calculó el LOD y LOQ, utilizando las curvas de calibración se calculó la

pendiente para cada amperograma, informando el valor promedio para cada caso.

En la Tabla 7 se observan los parámetros analíticos obtenidos a partir de los electrodos modificados con la dispersión con una diferencia de dos semanas

Tabla 7: parámetros analíticos comparativos de electrodo modificados con una dispersión Ni₂P/rGO 70/30% antes y después de dos semanas desde su preparación.

Parámetro	Semana 0	Semana 2
Rango Lineal (mM)	0,01 - 0,1	0,01 – 0,1
Sensibilidad (µA/mM)	42,8 ± 6,7	38,9 ± 5,4
LOD (µM)	6,02	2,38
LOQ (µM)	18,2	7,21

El rango de linealidad fue exactamente el mismo, mientras que la sensibilidad o pendiente promedio difieren. Dado que estos valores no son exactamente los mismos se hizo necesario la aplicación de un test estadístico que permita contrastar los valores de las medias de cada grupo. Para este caso, se aplicó el test T de student considerando que las medias de ambos grupos son independientes entre sí.

En función al test se proponen las siguientes hipótesis:

- H₀ (Hipótesis Nula): $\mu_1 = \mu_2 \rightarrow$ Las medias estadísticas de las sensibilidades de cada grupo son iguales.
- H₁ (Hipótesis Alternativa): $\mu_1 \neq \mu_2 \rightarrow$ Las medias estadísticas de las sensibilidades de cada grupo son diferentes.

Al contrastar las hipótesis en función a las medias de cada grupo de electrodos, y considerando un n de 10, se obtuvo que el p-valor (0,174) fue mayor al valor de la significancia o α (0.05). Así, con una confianza del 95%, se acepta la hipótesis nula y por lo tanto, se establece que las sensibilidades obtenidas de cada grupo son estadísticamente similares, no habiendo una diferencia significativa a pesar de modificar los electrodos de GC con una dispersión Ni₂P/rGO almacenada a lo menos por 2 semanas, en lo que respecta a la detección y sensibilidad frente al peróxido de hidrógeno.

Por otra parte, los límites de detección y de cuantificación presentan variaciones, lo cual puede deberse al hecho de que la dispersión es un sistema que no es homogéneo, en donde sus componentes no son totalmente miscibles, y por tanto luego de un primer uso puede existir cambios en el volumen inicial, alterando la concentración de cada uno de los compuestos y así, no ser exactamente igual a la primera vez que se utilizó.

- **Análisis y determinación de interferentes**

En función a información referida en la literatura, la determinación de interferentes es un parámetro importante para el desarrollo de un potencial sensor o biosensor. En este caso, proyectando su uso a una matriz sanguínea para la detección y cuantificación de glucosa a través de la electrocatálisis de peróxido, se describen de forma general el ácido ascórbico, ácido úrico, como

interferentes. Pero, además, se debe considerar en este caso si la glucosa es capaz de generar alguna respuesta en corriente que interfiera con la medición del peróxido.

También se consideró el sulfato de sodio en las mediciones amperométricas, con el fin de conocer si es capaz de generar respuesta en corriente o no.

Todos estos posibles interferentes fueron analizados por medio de amperometrías, para de esa forma saber si generan una señal eléctrica en corriente, que pudiese enmascarar o alterar la señal del analito en cuestión.

En el gráfico de la Figura 13 se puede observar 3 amperometrías realizadas, en donde fueron añadidas alícuotas de 40 μL de los potenciales interferentes, así como también del peróxido de hidrógeno. Las adiciones fueron equimolares entre sí, es decir que la concentración alcanzada por cada alícuota es igual en todas las sustancias, siendo esta de 0,05 mM.

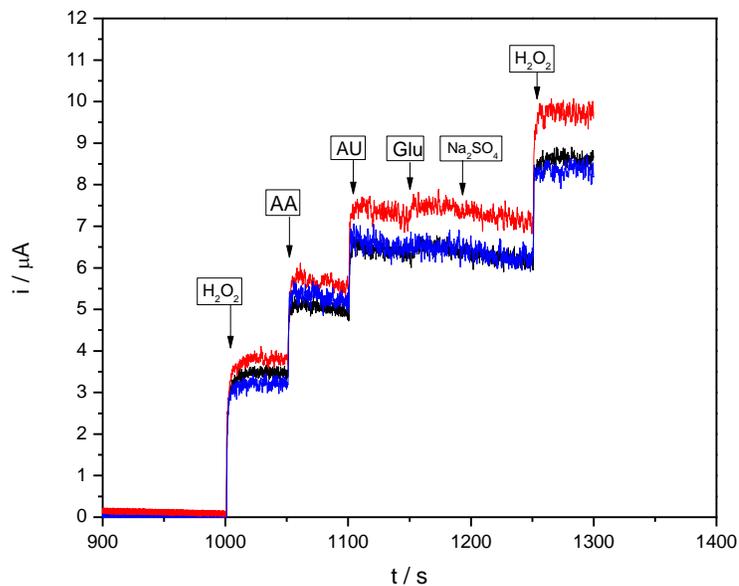


Figura 13. Amperometrías de posibles interferentes 0,05 mM a 0,400 V.

Al analizar cada una de las adiciones, el sulfato de sodio es el único compuesto que no genera señal alguna. Por su parte, el ácido ascórbico y el ácido úrico añadidos en los segundos 1050 y 1100 respectivamente, generan una señal a dicha concentración, que si bien no son exactamente igual de intensas que la del peróxido de hidrógeno, sí deben considerarse como interferentes.

Por otra parte, la glucosa genera un leve aumento en la corriente, por lo tanto no puede descartarse su capacidad de interferencia.

Para corroborar la intensidad de la señal de la glucosa se realizaron mediciones amperométricas, en las cuales se hicieron adiciones sucesivas de glucosa de concentración creciente.

Las concentraciones de glucosa seleccionadas fueron inicialmente equimolares a la adición de peróxido, y luego se utilizaron concentraciones 10 y 100 veces mayores a la inicial, lo que se observa en la Figura 14. En la Tabla 8 se muestran los tiempos de adición y de concentración en detalle.

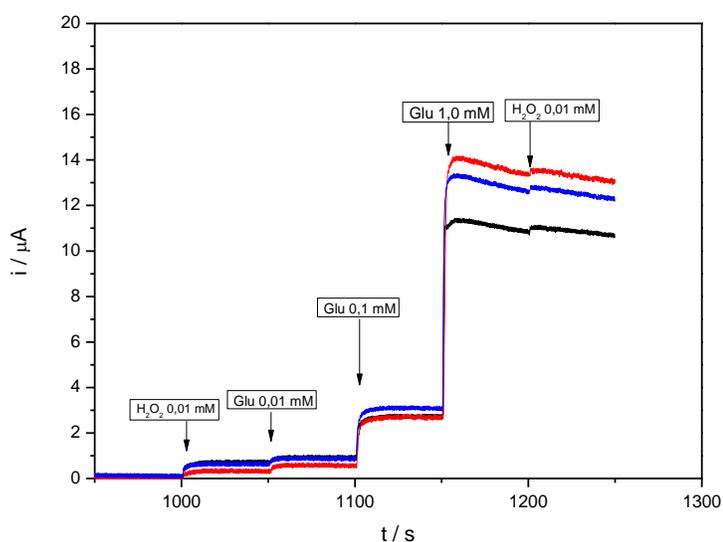


Figura 14. Amperometrías de H_2O_2 y glucosa a diferentes concentraciones.

Tabla 8: orden y tiempos de adición de analito y glucosa.

Tiempo (Seg)	Analito/interferente	Adición (mM)
1000	Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)	0,01
1050	Glucosa (Glu)	0,01
1100	Glucosa (Glu)	0,1
1150	Glucosa (Glu)	1,0
1200	Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)	0,01

Al analizar los amperogramas, todos coinciden en la existencia de respuesta en corriente, siendo esta cada vez mayor según la concentración de adición. Es así, que la glucosa debe considerarse como un interferente potencial para el sistema presentado.

Parte de este estudio también evaluó el uso de nafion para la mitigación de la señal que generan los ácidos previamente mencionados.

Este compuesto se define como un copolímero de carga negativa, descrito por poseer una buena conductividad y estabilidad química [17, 18]. Sin embargo, el principal motivo de elección de este compuesto para la disminución de la señal de interferentes se debe a su capacidad de selectividad de ciertos iones, permitiendo el paso o permeación de cationes, y la exclusión de aniones [19, 20]. Esto último es importante dado que, dos de los interferentes identificados, el ácido úrico y el ácido ascórbico, son sustancias con capacidad de ionizarse en función al pH del medio. Considerando sus valores de pKa de 5,4 y 4,1 respectivamente, en una solución a pH 12, estos se encuentran en un estado desprotonado, adquiriendo carga negativa. Por lo tanto, aumentar la concentración de nafion en las dispersiones permitiría formar o añadir una película que restrinja el paso de estos interferentes a la superficie del electrodo por repulsión de cargas [19, 20].

Para la evaluación del efecto del nafion en la disminución de la electrocatálisis de los interferentes, se realizaron dos pruebas distintas. En una de ellas, se

realizó la modificación de los electrodos de carbono vítreo con la dispersión Ni₂P/rGO 70/30%, de igual forma que en evaluaciones anteriores. Aunque en este caso luego de dicha modificación se realizó una segunda a través de la adición de 5 µL de una solución de nafion al 0,5%. Para esto, fue necesario evaluar el medio de disolución del nafion comercial (5%), utilizando distintas proporciones de agua Milli-Q e isopropanol, de forma tal que se permita la formación de una gota estable sobre la superficie del electrodo.

La segunda prueba consistió en preparar las dispersiones que contiene al material electrocerámico en la proporción Ni₂P/rGO 70/30%, con nafion en una concentración al 0,5%, reduciendo así el número de modificaciones a realizar.

En ambos casos se corroboró los parámetros analíticos en lo que respecta a la detección del peróxido de hidrógeno.

En la Tabla 9 se observan las diferentes proporciones utilizadas para la disolución del nafion, preparadas para obtener una concentración 0,5% p/v, así como también si logran o no la formación de una gota en la superficie del electrodo.

Tabla 9: medio de disolución de nafion comercial (5%).

Volumen total (µL)	Nafion 5% (µL)	Agua Mili - Q (µL)	Isopropanol (µL)	Formación de gota
1000	100	0	900	No
1000	100	600	300	No
1000	100	800	100	Sí, pero inestable
1000	100	850	50	Sí

En función a las distintas proporciones utilizadas, la cuarta proporción es la que permitió formación de una gota con una tensión superficial tal, que logra recubrir la zona activa del electrodo, además de mantenerse estable, evitando que esta precipite y escurra sobre este.

En el gráfico de la Figura 15 se presenta el conjunto de amperogramas obtenidos a partir de adiciones de peróxido de hidrógeno 0,01 mM, pero con electrodos modificados con los compositos y posterior adición de nafion 0,5%. En la Tabla 10 se recopilan los parámetros analíticos a partir de dichas mediciones.

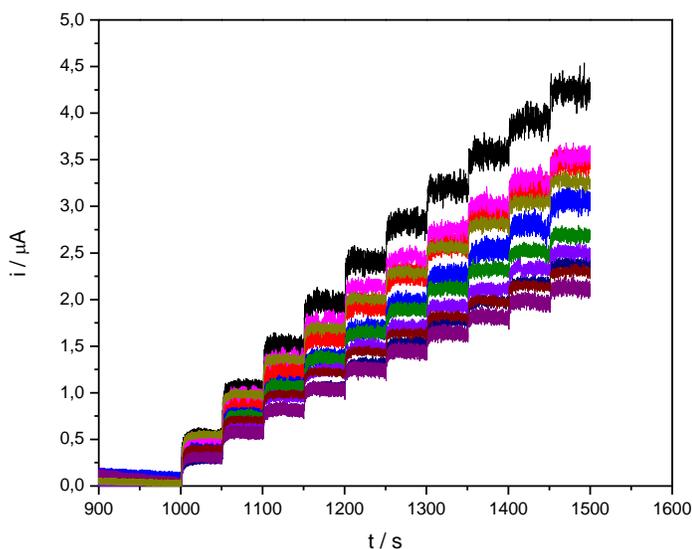


Figura 15. Amperometrías de 0,01 mM con electrodo de GC modificados con $\text{Ni}_2\text{P/rGO}$ 70/30% y nafion 0,5%.

Tabla 10: Parámetros Analíticos Obtenidos de Electrodo Modificado con Ni₂P/rGO y post-adición de Nafion 0,5%.

Parámetro	Electrodo GC/Ni₂P/rGO (<i>Ex situ</i>)
Rango lineal (mM)	0,01 - 0,1
Sensibilidad (μA/mM)	28,0 ± 6,7
LOD (μM)	4,83
LOQ (μM)	14,6

Al analizar los parámetros analíticos descritos en la Tabla 10, se puede observar que el rango de linealidad fue de 0,01 a 0,1 mM. Aunque, existe una disminución en el grado de sensibilidad, así como también un aumento en los límites de detección y cuantificación. A pesar de ello, se sigue percibiendo una respuesta electroquímica, y por lo tanto la posterior modificación con nafion sigue permitiendo la detección y cuantificación de peróxido de hidrógeno.

Los amperogramas de la Figura 16 fueron obtenidos a partir de la medición y testeo en la respuesta de los interferentes. El volumen de las alícuotas fue de 40 μL, alcanzando concentraciones 0,05 mM por adición.

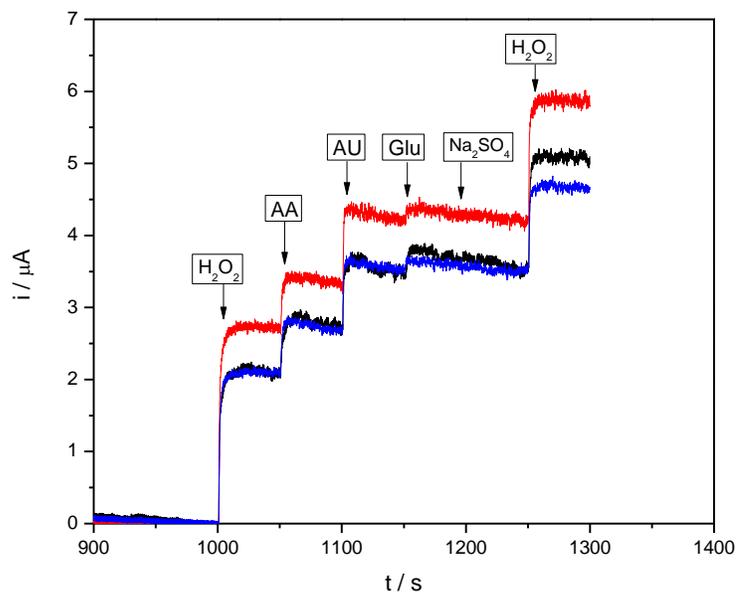


Figura 16. Amperometrías interferentes equimolares con electrodos de GC modificados con Ni₂P/rGO 70/30% y nafion 0,5%.

Considerando los amperogramas, nuevamente el sulfato de sodio no generó respuesta alguna. La glucosa por su parte, de igual forma a lo previamente establecido generó una leve perturbación de la señal a dicha concentración. En el caso de los ácidos, ambos generaron respuesta en corriente, siendo esta notoria, pero en ningún caso mayor a la generada por el peróxido de hidrógeno, ya que este último genera el mayor salto de corriente.

Para comparar el efecto neto del nafion, se presentan los amperogramas de la Figura 17, los cuales representan la adición de los interferentes, pero en este

caso comparando entre electrodos modificados con Ni₂P/rGO 70/30%, con y sin la posterior modificación de nafion al 5%.

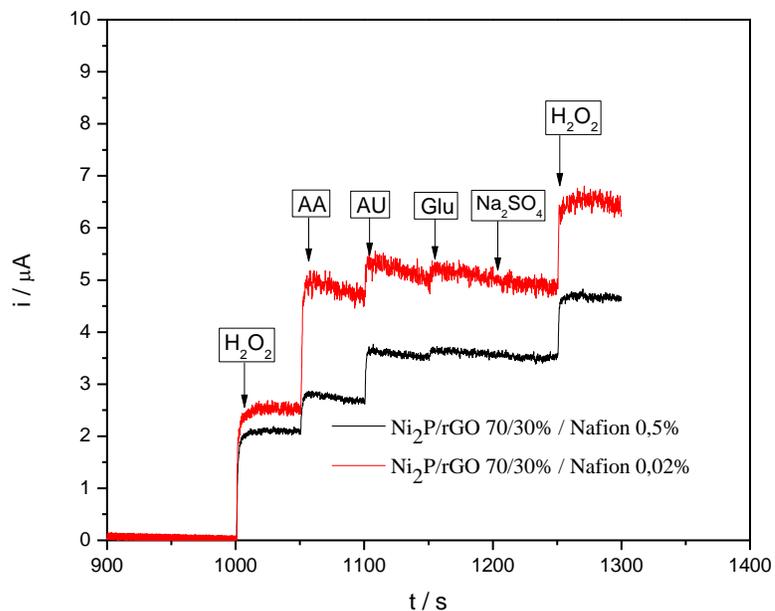


Figura 17. Amperometrías comparativas de interferentes con electrodos de GC modificados Ni₂P/rGO 70/30% y nafion en distintas concentraciones.

Al contrastar ambos amperogramas de la figura 17, se denota el efecto de nafion en la medición. Esto, porque en el caso de la posterior modificación con nafion 0,5% existe una disminución notoria para el caso de la señal del ácido ascórbico, mientras que para el caso del ácido úrico se genera una señal que en intensidad es similar a la obtenida para el caso de electrodo sin la modificación. Con respecto a la señal de peróxido existe una diferencia mínima en el salto de

corriente obtenido, pero como ya se denotó en los parámetros analíticos existe una disminución de la sensibilidad.

El segundo método para lograr la disminución de la intensidad de la señal de los interferentes, consistió en la preparación de una dispersión Ni₂P/rGO de proporción 70/30% y nafion al 0,5%.

Frente a este punto se debe mencionar que fue necesario corroborar y seleccionar un medio de dispersión. En este caso se llegó a probar cuatro medios diferentes, los cuales aparecen descritos en la siguiente tabla

Tabla 11: medios de dispersión para modificación de electrodos de carbono vítreo con Ni₂P/rGO y nafion al 0.5%.

Soluciones	Agua Mili-Q (μL)	Isopropanol (μL)	Nafion 5% (μL)	Volumen Final (μL)
1	850	50	100	1000
2	800	100	100	1000
3	700	200	100	1000
4	4000	500	500	5000

En las primeras tres soluciones, la preparación fue directa en un eppendorf con capacidad de 2 mL. Para el caso de la cuarta se preparó la solución en un matraz de 5 mL, sonicándola. Posteriormente, de esta se tomó una alícuota de 1 mL para dispersar al fosforo de níquel y al óxido de grafeno reducido contenidos en el eppendorf de 2 mL.

Para todos los casos, se evaluó en una primera instancia la capacidad de detección y cuantificación de peróxido, motivo por el cual se realizaron

mediciones amperométricas para determinar los parámetros analíticos de los electrodos modificados con estas dispersiones.

Es así, que en ninguno de los casos se logró establecer un amperograma que tuviese una respuesta de corriente similar a los sistemas antes trabajados, siendo estas imperceptibles. Por lo tanto, este sistema no permitió la correcta detección del peróxido de hidrógeno, a diferencia de la modificación con nafion luego de la modificación de fosfuro de níquel y óxido de grafeno reducido.

➤ **Caracterización de superficie de electrodos modificados con dispersiones de Ni₂P/rGO.**

La caracterización superficial de la superficie se realizó a través de tres técnicas, siendo estas la Microscopía Electrónica de Barrido (o SEM en su sigla del inglés), Espectroscopia de Rayos X dispersivo en Energía (o EDX) y la determinación del Ángulo de Contacto. Las cinco dispersiones preparadas fueron sometidas a cada una de las técnicas.

- **Determinación del Ángulo de Contacto**

La medición del ángulo de contacto que forma la gota de un líquido sobre cierta superficie es una técnica útil y de fácil aplicación, la cual entrega información acerca de las propiedades fisicoquímicas del material sólido que conforma dicha superficie. A través de esta técnica se puede conocer el grado de “*mojabilidad*” que alcanza el líquido sobre el sólido en el cual se dispone la gota, que en caso de tratarse de agua, sería una forma de evaluar el grado de hidrofiliidad de la superficie [21].

De esta manera, mientras menor el ángulo de contacto, de mayor hidrofiliidad será la superficie con la cual se pone en contacto la gota de agua. En contraparte, cuanto mayor sea el ángulo de contacto, menor grado de hidrofiliidad tendrá el material [21].

En la Figura 18, se puede observar de forma gráfica la formación del ángulo de contacto, el cual se describe como el ángulo formado entre la intersección de las fases líquido – vapor y sólido – líquido; delimitado con una tangente imaginaria que nace de la intersección líquido – vapor [21].

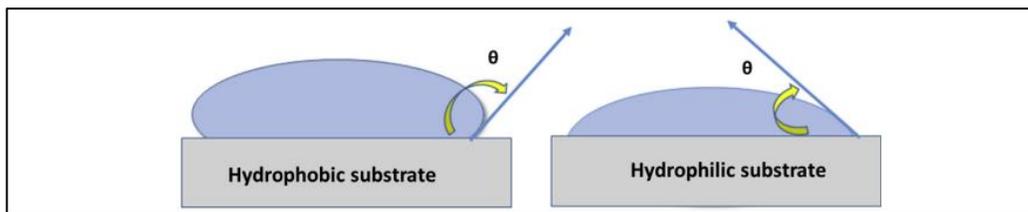


Figura 18. Representación esquemática del ángulo de contacto, en distintos tipos de superficies.

Es así, que en una superficie hidrofóbica el ángulo de contacto formado al disponer la gota de agua será mayor, puesto que las moléculas del líquido ven favorecida la interacción entre ellas y no con las de la superficie. Mientras que en superficies hidrofílicas el ángulo formado es menor, dado que las moléculas de agua ven favorecida la interacción con la superficie, aumentando la superficie de contacto [21]. Normalmente, en el primer caso se logra ver una gota mejor formada, mientras que en el segundo caso la gota se observa más aplanada.

La clasificación del material depende de la magnitud de los grados que caracterizan al ángulo, en donde:

- Ángulo $> 90^\circ$ \rightarrow Hidrofóbico
- Ángulo $< 90^\circ$ \rightarrow Hidrofílico

En el esquema de la Figura 19 se observa de manera gráfica la clasificación según los grados que del ángulo.

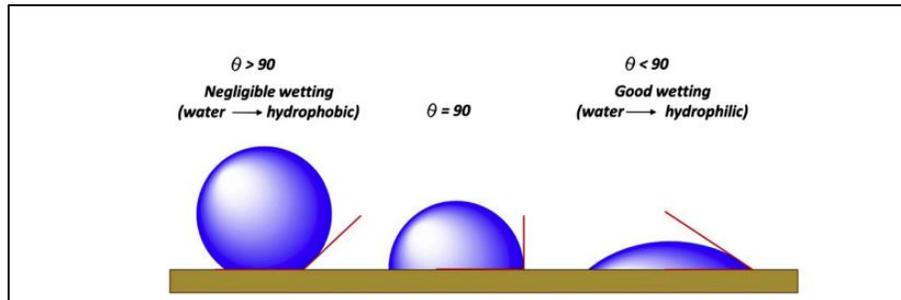


Figura 19. Clasificación del grado de interacción de la superficie con el agua en función al ángulo de contacto medido.

Considerando la información ya expuesta, para lograr una caracterización fisicoquímica del material electrocerámico en estudio, el método del ángulo de contacto resulta útil para definir su grado de afinidad con el agua. En este caso se usaron discos de carbono vítreo los cuales fueron modificados bajo el mismo procedimiento que en el caso de los electrodos, utilizando todas proporciones propuestas en el estudio.

Para esto, el disco de carbono vítreo se modificó con 10 μL de dispersión, separadas en adiciones de 5 μL con posterior secado en estufa a 50 $^{\circ}\text{C}$, de igual forma a como se modificaron los electrodos, teniendo la precaución de que la segunda adición se disponga directamente donde fue realizada la primera. Luego, para la medición del ángulo de contacto, se adicionaron 5 μL de agua Milli-Q, disponiendo esta directamente sobre la zona modificada del disco.

La alícuota de agua seleccionada para la medición del ángulo de contacto se basó en el volumen de dispersión con el cual se realiza la modificación de la superficie de carbono vítreo, siendo esta de 5 μL . Esto, porque permite adicionar un volumen de agua que logra estar en contacto completo y exclusivo con la zona del disco modificada, evitando así las zonas que no lo están.

Cada dispersión fue evaluada por triplicado, calculando y reportando el valor promedio de los ángulos, según se observa en la Tabla 12.

En la Figura 20 se puede observar cada una de las imágenes obtenidas a partir de las fotografías mediante el uso del goniómetro.

Modificación	Disco 1	Disco 2	Disco 3
Sin modificación			
Ni ₂ P/rGO (30/70)			
Ni ₂ P/rGO (40/60)			
Ni ₂ P/rGO (50/50)			
Ni ₂ P/rGO (60/40)			
Ni ₂ P/rGO (70/30)			

Figura 20. Imágenes obtenidas a partir de la determinación del ángulo de contacto sobre discos de GC modificados con Ni₂P/rGO en el rango de proporción 30/70 - 70/30%.

Tabla 12: valores obtenidos de los ángulos de contacto y su clasificación.

Modificación disco GC	Disco 1	Disco 2	Disco 3	Ángulo promedio (Grados)	Clasificación
Sin modificación	69,0	70,3	66,3	68.5 ± 2,0	Hidrofílico
Ni ₂ P/rGO (30/70)	92,4	89,1	85,0	88,3 ± 3,7	Hidrofílico
Ni ₂ P/rGO (40/60)	74,0	73,0	73,0	73,4 ± 0,5	Hidrofílico
Ni ₂ P/rGO (50/50)	88,0	84,7	81,0	84,6 ± 3,5	Hidrofílico
Ni ₂ P/rGO (60/40)	92,0	87,1	80,9	86,7 ± 5,5	Hidrofílico
Ni ₂ P/rGO (70/30)	79,0	71,9	78,0	76,3 ± 3,8	Hidrofílico

En función a los grados obtenidos, se puede establecer que de forma general los compositos tienen un comportamiento hidrofílico, aunque algunos de ellos se encuentran al límite de ser clasificados como hidrófobos.

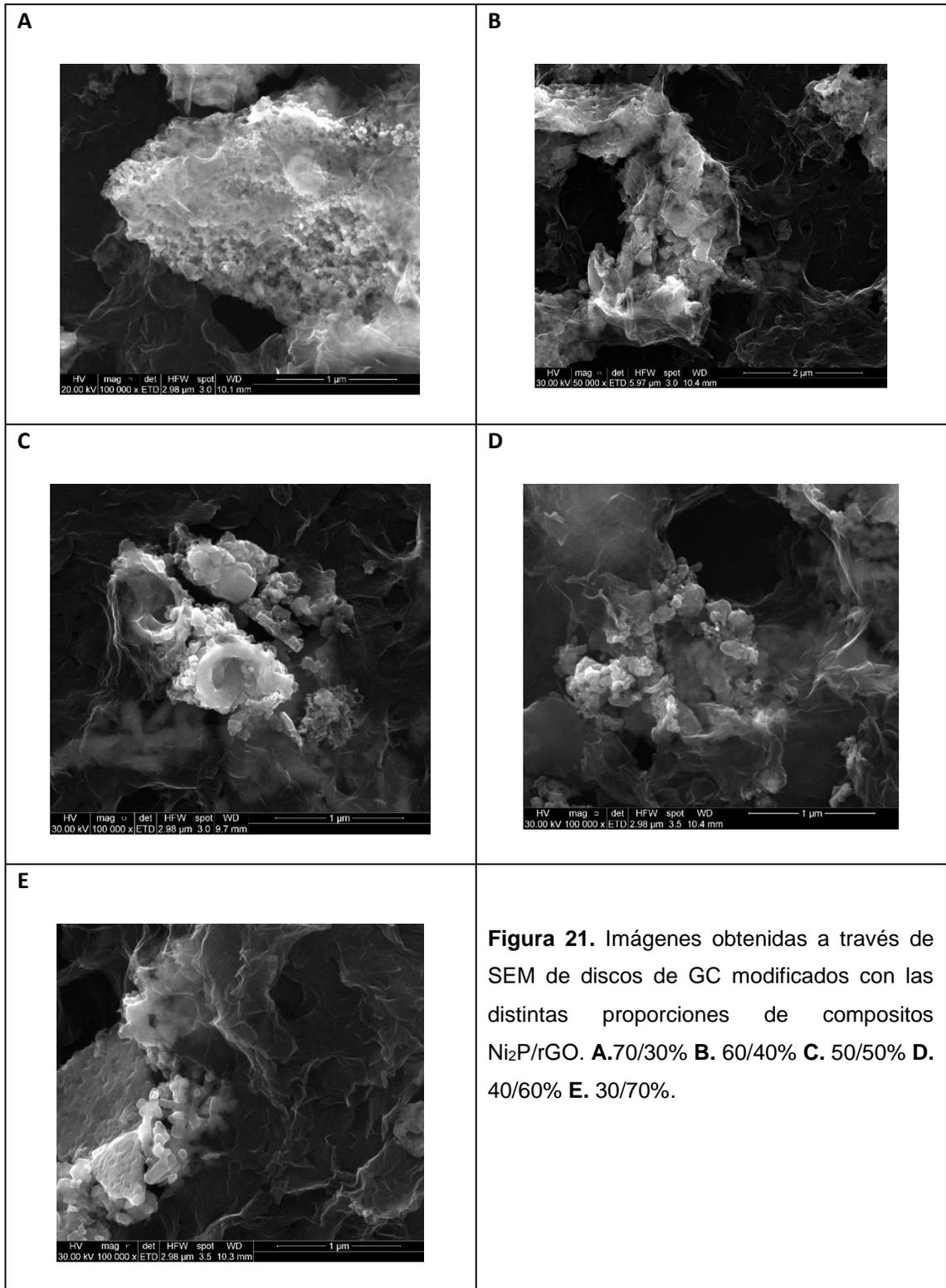
Se debe tener en cuenta que el volumen que se seleccionó se basó en el volumen de dispersión con el cual se realiza la dispersión, siendo en este caso 5 µL. Esto, porque permite adicionar una alícuota que logre estar en contacto completo con la zona del disco GC modificado, evitando así las zonas no modificadas.

Al comparar los discos GC modificados con los no modificados, se denota que el grado hidrofiliidad disminuye con la presencia de los compositos, sin llegar al límite de la hidrofobicidad.

- **Caracterización morfológica y topológica de superficie de carbono vítreo modificada con compositos de Ni₂P/rGO en distintas proporciones.**

Para la caracterización de la superficie de carbono vítreo modificada con dispersiones que contienen diferentes proporciones de los compositos Ni₂P/rGO se utilizó la técnica SEM. De forma general, esta microscopia se basa en un haz de electrones concentrados y acelerados que al incidir con la superficie de la muestra se genera la imagen topológica, debido a la liberación de electrones secundarios (ES) que permiten la formación de la imagen detallada en lo que respecta a la textura y rugosidad de la superficie [22].

En la Figura 21 se observan las imágenes obtenidas con diversas modificaciones de superficies de carbono vítreo.



En las imágenes se puede observar el óxido de grafeno reducido, como una tela que entra en contacto e incluso envolviendo las partículas del material electrocerámico. Siendo este último el material particulado, de formas variadas que se encuentran en contacto con el rGO.

- **Caracterización composicional de la superficie de carbono vítreo modificada con compositos de Ni₂P/rGO 70/30%.**

Similar a la microscopía electrónica, la espectroscopía de energía dispersiva de rayos X, se basa en la interacción de un haz de electrones que incide en la superficie, generando la emisión en este caso de rayos X. Considerando que cada tipo de átomo posee un espectro de emisión de rayos X, esta técnica permite diferenciar, caracterizar e incluso cuantificar la concentración de cada tipo de átomo que se encuentre presente en la superficie muestra [22].

Las imágenes de la Figura 22 representan la distribución espacial dentro de la muestra de los distintos tipos de átomos que fueron pesquisados en su superficie. Considerando los principales componentes de los compositos, al haber fosforo de níquel, es importante corroborar la posición o ubicación de estos, esperando que en las mismas zonas en donde se encuentre níquel, se encuentre el fósforo, así como también el primero se encuentre en una mayor proporción que el segundo.

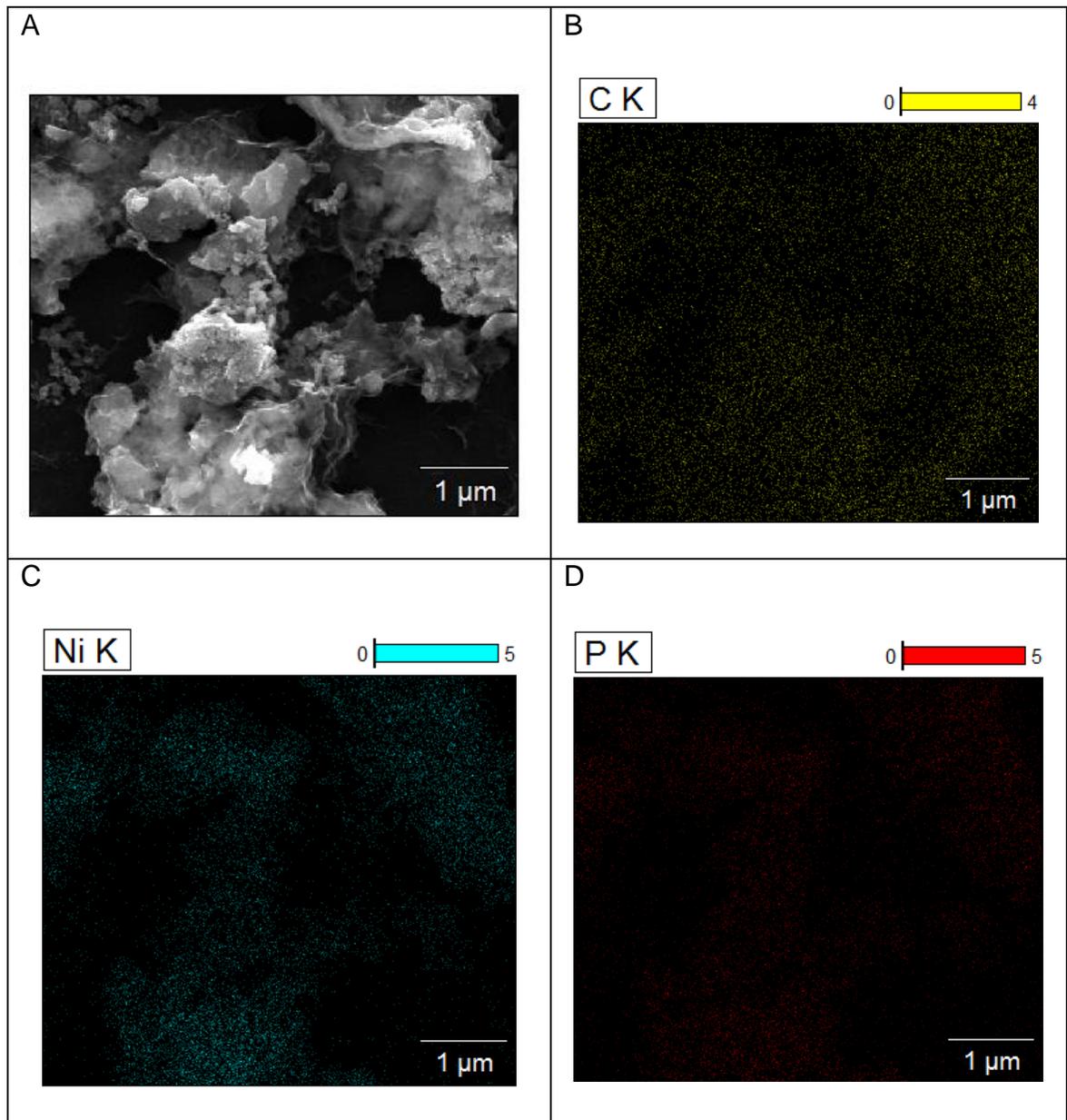


Figura 22. Imágenes SEM y EDX de discos de GC. **A.** Imagen SEM de modificación con Ni₂P/rGO 70/30%. **B.** distribución de carbono **C.** distribución de níquel **D.** distribución de fósforo.

La primera imagen fue obtenida mediante SEM, y en función a dicha foto es que se obtuvieron las otras mediante la técnica EDX, en donde se aprecia la distribución y la ubicación de cada tipo de átomo presente en la sección el disco modificado.

En la imagen se representan distintas estructuras de formas irregulares, en otras un poco más esféricas. Estas estructuras corresponden al material electrocerámico, es decir al Ni_2P , lo cual se denota dado que las imágenes obtenidas por EDX indican que en dichas zonas existe la presencia de fósforo (marcado en rojo) y níquel (marcado en celeste), teniendo este último un mayor grado de densidad dado la fórmula de este compuesto. Por otra parte, el óxido de grafeno reducido se puede ver mucho más disperso a lo largo de la muestra, sin necesariamente concentrarse en las mismas zonas en las que se encuentra el fosforo de níquel. Esto último dado que la preparación de la dispersión, y eventualmente del composito es por vía *ex situ*, es decir, que solo se debe a la unión y contacto físico de ambas. Es así, que se pueden distinguir ambos compuestos a partir de las imágenes SEM, pero también se puede notar como el óxido de grafeno en ciertas partes envuelve y/o rodea al fosforo de níquel. Esto, ya que el óxido de grafeno reducido se encuentra altamente distribuido a lo largo de toda la superficie.

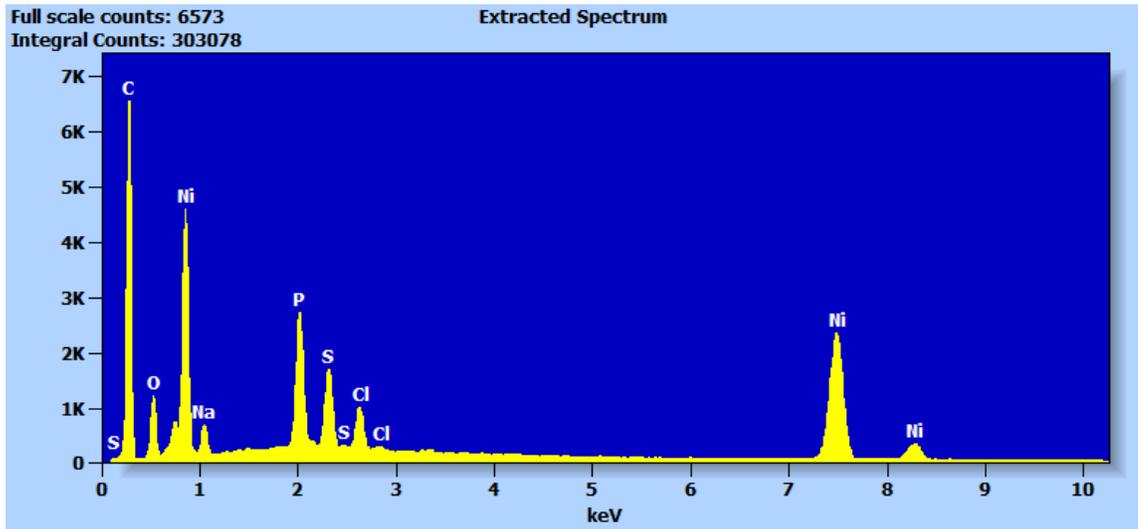


Figura 23. Espectro obtenido mediante EDX de la superficie del disco de GC modificado con Ni₂P/rGO 70/30%.

Tabla 13: Resumen composicional del espectro de EDX, a partir de la superficie de GC modificada con Ni₂P/rGO 70/30%.

Element	Extracted Spectrum						
	Net Counts	Net Counts err	Weight %	Weight % err	Atom %	Atom % err	Compound %
Cl K	7959	243	1.50	0.05	0.67	0.02	1.50
S K	14892	315	2.53	0.05	1.25	0.03	2.53
Na K	3572	147	2.88	0.12	1.97	0.08	2.88
P K	24552	322	4.50	0.06	2.29	0.03	4.50
Ni K	40034	395	16.07	0.16	4.32	0.04	16.07
O K	5519	136	17.59	0.43	17.35	0.43	17.59
C K	33445	203	54.93	0.33	72.16	0.44	54.93
			100.00		100.00		100.00

La Figura 23 representa el espectro en donde aparecen las señales de todos los átomos detectados, y en la Tabla 13 se muestra la valoración de cada uno de los parámetros en unidades porcentuales. Existe la presencia de ciertos interferentes, siendo estos cloro, sodio, azufre y oxígeno, en donde este último el

que se encuentra en mayor cantidad. Por otra parte, el carbono es aquel que se encuentra en mayor proporción, aunque se debe considerar que el disco sobre el cual se trabaja también es carbono, y por tanto pudiese estar aportando a la señal, siendo esta no del todo exclusiva al carbono proveniente del óxido de grafeno reducido. En relación al fosforo de níquel se denota que el níquel se encuentra siempre en una mayor proporción que el fosforo.

5. Conclusiones

- Los electrodos de carbono vítreo modificados con Ni₂P/rGO en un rango de proporciones de 30/70% – 70/30% mediante el método drop casting, lograron obtener una respuesta electroquímica siendo caracterizada mediante voltametría cíclica, utilizando ferroceno metanol como mediador redox.
- Utilizando la amperometría como técnica electroquímica, se escogió la proporción de Ni₂P/rGO 70/30% y un potencial de trabajo 0,400 V dado que, este sistema permitió la mejor cuantificación de peróxido de hidrógeno, en lo que respecta a la intensidad y reproducibilidad de respuesta de corriente, así como de la eficiencia energética requerida para la electrocatálisis del analito.
- Se determinaron los parámetros analíticos asociados a la detección de peróxido de hidrógeno que logran los electrodos de carbono vítreo modificados con Ni₂P/rGO 70/30% a un potencial de 0,400 V, frente a distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno, así como también hasta cuales valores de concentración de analito generan una respuesta aceptable.
- Se estudió la respuesta de distintos compuestos con tal de conocer la su capacidad de interferencia, identificando al ácido úrico y ácido ascórbico.

- Se realizó el estudio topológico y composicional mediante las técnicas SEM y EDX, así como también, mediante el ángulo de contacto se identificó un comportamiento de la superficie modificada de tipo hidrofílico.

6. Referencias

1. Kharroubi, A. T., & Darwish, H. M. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World journal of diabetes*, 6(6), 850–867. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i6.850>
2. Diabetes. (s. f.). World Health Organization. Recuperado 20 de abril de 2021, de https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1
3. Oliver NS, Toumazou C, Cass AE, Johnston DG. Glucose sensors: a review of current and emerging technology. *Diabet Med*. 2009 Mar;26(3):197-210.
4. Ali A. Ensafi, Capítulo 1 - An introduction to sensors and biosensors, Editor(es): Ali A. Ensafi, *Electrochemical Biosensors*, Elsevier, 2019, Pág 1-10
5. Grieshaber D, MacKenzie R, Vörös J, Reimhult E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors (Basel)*. 2008 Mar 7;8(3):1400-1458.
6. Ekin Sehit, Zeynep Altintas, Significance of nanomaterials in electrochemical glucose sensors: An updated review (2016-2020), *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 159, 2020.
7. Teymourian, Hazhir; Barfidokht, Abbas; Wang, Joseph (2020). Electrochemical glucose sensors in diabetes management: an updated review (2010-2020). *Chemical Society Reviews*, 10.1039. D0CS00304B—. doi:10.1039/D0CS00304B
8. Yoo EH, Lee SY. Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice. *Sensors (Basel)*. 2010;10(5):4558-76.
9. Yin D, Tang J, Bai R, Yin S, Jiang M, Kan Z, Li H, Wang F, Li C. Cobalt Phosphide (Co₂P) with Notable Electrocatalytic Activity Designed for Sensitive and Selective Enzymeless Bioanalysis of Hydrogen Peroxide. *Nanoscale Res Lett*. 2021 Jan 13;16(1):11.
10. Shanshan Luo, Peng Hei, Ran Wang, Juanjuan Yin, Wei Hong, Shufeng Liu, Zhenhua Bai, Tifeng Jiao, Facile synthesis of cobalt phosphide nanoparticles as highly active electrocatalysts for hydrogen evolution reaction, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Volumen 600, 2020.
11. M. Streckova, R. Orinakova, J. Hovancova, M. Heckova, A. Guboova, V. Girman, E. Mudra, Z. Dankova, A. Bekenyoova, J. Dusza, Novel electrocatalysts for hydrogen evolution based on carbon fibers modified by cobalt phosphides, *Applied Surface Science*, Volumen 507, 2020.

12. Shahab Maghsoudi, Arman Mohammadi, Reduced graphene oxide nanosheets decorated with cobalt oxide nanoparticles: A nonenzymatic electrochemical approach for glucose detection, *Synthetic Metals*, Volumen 269, 2020.
13. Alan Meng, Haiqin Zhang, Baihe Huangfu, Wenli Tian, Liying Sheng, Zhenjiang Li, Shuqin Tan, Qingdang Li, Bimetal nickel–cobalt phosphide directly grown on commercial graphite substrate by the one-step electrodeposition as efficient electrocatalytic electrode, *Progress in Natural Science: Materials International*, Volume 30, Issue 4, 2020, Pág 461-468.
14. Deborah D.L. Chung, *Carbon Composites (Second Edition)*, Butterworth-Heinemann, 2017, Pág 1-87.
15. Amir Ata Saei, Jafar Ezzati Nazhad Dolatabadi, Parvaneh Najafi-Marandi, Alireza Abhari, Miguel de la Guardia, Electrochemical biosensors for glucose based on metal nanoparticles, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 42, 2013, Pág 216-227.
16. Rafiq Ahmad, Otto S. Wolfbeis, Yoon-Bong Hahn, Husam N. Alshareef, Luisa Torsi, Khaled N. Salama, Deposition of nanomaterials: A crucial step in biosensor fabrication, *Materials Today Communications*, Volumen 17, 2018, Pág 289-321.
17. Xinyu Yang, Yueying Zhang, Xidong Hao, Yang Song, Xishuang Liang, Fengmin Liu, Fangmeng Liu, Peng Sun, Yuan Gao, Xu Yan, Geyu Lu, Nafion-based amperometric H₂S sensor using Pt-Rh/C sensing electrode, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volumen 273, 2018, Pág 635-641.
18. Engin Er, Hüseyin Çelikkan, Nevin Erk, A novel electrochemical nano-platform based on graphene/platinum nanoparticles/nafion composites for the electrochemical sensing of metoprolol, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volumen 238, 2017, Pág 779-787.
19. Zheng Xu, Meng-qi Zhang, Hong-qun Zou, Jun-shan Liu, Da-zhi Wang, Jing Wang, Li-ding Wang, Non-enzymatic electrochemical detection of uric acid with electrodeposited Nafion film, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Volume 841, 2019, Pág 129-134.
20. Hongmei Cao, Ailing Yang, Hua Li, Lele Wang, Shunpin Li, Jilie Kong, Xichang Bao, Renqiang Yang, A non-enzymatic glucose sensing based on hollow cuprous oxide nanospheres in a Nafion matrix, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volumen 214, 2015, Pág 169-173.

21. R.S. Hebbar, A.M. Isloor, A.F. Ismail, Chapter 12 - Contact Angle Measurements, Editor(es): Nidal Hilal, Ahmad Fauzi Ismail, Takeshi Matsuura, Darren Oatley-Radcliffe, Membrane Characterization, Elsevier, 2017, Pág 219-255
22. M. Abd Mutalib, M.A. Rahman, M.H.D. Othman, A.F. Ismail, J. Jaafar, Capítulo 9 - Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy-Dispersive X-Ray (EDX) Spectroscopy, Editor(es): Nidal Hilal, Ahmad Fauzi Ismail, Takeshi Matsuura, Darren Oatley-Radcliffe, Membrane Characterization, Elsevier, 2017, Pág 161-179.