



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Maestría En Ciencias en Nanotecnología

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR NANOFLUÍDICO PARA LA
DETECCIÓN DE METABOLITOS EN SUDOR

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias en Nanotecnología

Presenta:

Ing. Dulce Victoria Estrada Osorio

Dirigido por:

Dra. Janet Ledesma García

Co-dirigido por:

Dr. Ricardo Antonio Escalona Villalpando

Dra. Janet Ledesma García

Presidente

Dr. Ricardo Antonio Escalona Villalpando

Secretario

Dra. Minerva Guerra Balcázar

Vocal

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña

Suplente

Dr. José Alberto Morales Rodríguez

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

5 de noviembre de 2019

México

RESUMEN

En este proyecto se desarrolló un biosensor de glucosa tipo parche que consiste en electrodos contruidos de nanofibras de carbono (NFC). El biosensor es tipo voltamperométrico, en el que el electrodo de trabajo se deposita una película de Ferroceno-Poli-L-Lisina con la enzima glucosa oxidasa inmovilizada. Este polímero, el cual no se había reportado anteriormente, es utilizado como especie para la detección de glucosa o de alguna otra sustancia. En análisis realizados a pH 5.6 el biosensor registra un límite de cuantificación de 1.34 mM, límite de detección de 0.4 mM, sensibilidad igual a $4 \mu\text{A}/\text{mM cm}^2$, tiene una constante de Michaelis-Menten de 5.25 mM y alcanza una corriente máxima de 1.6 μA en análisis de rango de 0 a 5 mM de glucosa. Presenta excelente comportamiento en presencia de interferentes como dopamina (0.05 mM), ácido úrico (0.2 mM) y ácido ascórbico (0.001 mM). Aunado a este biosensor, se desarrolló un sensor potenciométrico de cloruros contruido a base de Ag/AgCl sobre NFC con una capa de agar sobre la superficie de este como capa protectora. Este sensor tiene un límite de cuantificación de 178.21 mM, límite de detección de 53.46 mM con una sensibilidad de $0.0024 \text{ V}/\text{mM cm}^2$ con una caída de potencial de 83.1 mV/dec. Estas pruebas se realizaron analizando concentraciones de cloruro de potasio (KCl) en una solución de pH 5.6, sin embargo, este sensor requiere de modificaciones para poder utilizarse en tipo parche. El dispositivo electrónico contruido cuenta con un microcontrolador Arduino, un conversor de voltaje a corriente y un amplificador de corriente, este dispositivo envía las señales de corriente obtenidas por los electrodos a una computadora para su posterior procesamiento. Si bien el dispositivo cumple con la función principal, que es detectar glucosa, tiene la limitante de que sólo reconoce corrientes mayores a 1 μA , por lo que se propone su posterior optimización para que pueda cumplir con su objetivo, así como el acoplamiento de otros electrodos al mismo dispositivo.

(Palabras clave: biosensor, Oxidación de glucosa, Detección de cloruros, parche, sudor, glucosa oxidasa, poli-l-lisina)

SUMMARY

A patch glucose biosensor was developed in this project; it consists in electrodes constructed with carbon nanofibers (NFC). This biosensor is voltammetric in which the working electrode has a deposit of a synthesis of Ferrocene-Poly-L-lysine with the enzyme glucose oxidase immobilized. This polymer has not been reported previously, and now is used as a detection specie of glucose or any other substance, in analysis performed at pH 5.6 the biosensor registers 1.34 mM and 0.4 mM of quantification and sensibility limits, respectively. It has a Michaelis-Menten constant (K) of 5.25 mM and reaches 1.6 μA of maximum current in analysis with range from 0 to 5 mM glucose. This biosensor presents an excellent behavior in the presence of interfering substances such as dopamine (0.05 mM), uric acid (0.2 mM) and ascorbic acid (0.001 mM). Added to this biosensor, a potentiometric chloride sensor was developed, which was based in Ag/AgCl deposited over NFC with an agar coating over the surface of the electrode as a protector coat, this sensor has 178.21 mM of quantification limit, 53.46 mM of detection limit with a sensibility of 0.0024 V/mM cm^2 with a potential drop of 83.1 mV/dec., this tests were performed analyzing potassium chloride (KCl) concentrations in a pH 5.6 solution, however this sensor requires of further modifications to be ready to use it as a patch sensor. The electronic device built counts with an Arduino microcontroller, a voltage converter and a current amplifier; this device sends the current signals given by the electrodes to a computer for its further processing. Even though the device accomplishes with the principal function of glucose detection, it has the limitation that it only recognizes currents bigger than 1 μA , because of this limitation a future optimization is recommended, this with the objective of accomplish with it main goal, such a future coupling of other electrodes to the same device.

(Key words: biosensor, glucose oxidation reaction, chloride detection, patch, sweat, glucose oxidase, poly-l-lysine)

Dirección General de Bibliotecas UAQ

A mi papá y a mi mamá: Rogelio y Sagrario, a mis hermanos: Miriam y Pablo.

A mi pequeño, mi regalo, mi hijo.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece ampliamente el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para el desarrollo de esta investigación realizada a lo largo de dos años.

También agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro por permitirme ser parte de esta institución y facilitar las instalaciones necesarias para el desarrollo de este proyecto.

Especialmente agradezco al Laboratorio Nacional de Micro y Nanofluídica (LABMyN) LN-2018 293442, por la ayuda y la guía otorgada por los miembros de este y a los que compartieron laboratorio conmigo.

A mi familia por ser el pilar de fuerza que siempre está ahí y mi motor, no hay palabras que describan lo agradecida que estoy con ustedes. A Ñoño, a Boli y a Vesh, porque el hablar con ustedes siempre me recuerda la razón de mis decisiones.

A mis compañeros de generación, a mis amigos de otros programas y a todos los que en su momento extendieron su apoyo emocional, porque el estar con ustedes siempre me genera felicidad.

A ti que en su momento me impulsaste a seguir y que me dejaste mi mayor regalo, mi hijo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 ANÁLISIS DE SUDOR Y SU VÍNCULO A ENFERMEDADES	11
1.2 TÉCNICAS DE BIOANÁLISIS.....	13
1.3 DE SENSORES, BIOSENSORES Y DISPOSITIVOS	15
1.3.1 <i>Sensores</i>	15
1.3.2 <i>Biosensores</i>	16
2. HIPÓTESIS	20
3. OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GENERAL	20
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
4. METODOLOGÍA	21
4.1 BIOSENSOR DE GLUCOSA	21
4.1.1 <i>Síntesis Ferroceno-Quitosano</i>	21
4.1.2 <i>Síntesis Ferroceno-(Poli-L-Lisina)</i>	23
4.1.3 <i>Fabricación de los electrodos de nanofibras de carbono para su uso como biosensor de glucosa</i>	24
4.1.4 <i>Fabricación de electrodo de referencia y contra electrodo para construcción del biosensor de glucosa tipo parche</i>	25
4.2 SENSOR DE CLORUROS.....	25
4.3 DISPOSITIVO ELECTRÓNICO	26
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
5.1 BIOSENSOR DE GLUCOSA	28
5.1.1 <i>Síntesis de Fc-CHIT</i>	28
5.1.2 <i>Síntesis de Fc-PLL</i>	36
5.1.3 <i>Electrodos de nanofibras de carbono (NFC)</i>	41
5.2 SENSOR DE CLORUROS.....	49
5.3 DISPOSITIVO ELECTRÓNICO	56
6. CONCLUSIONES	59
6.1 PERSPECTIVAS DEL PROYECTO.....	60
7. REFERENCIAS	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Algunos sensores no invasivos para sudor reportados.....	19
Tabla 2 Tabla comparativa de modificaciones de síntesis de Fc-CHIT.....	37
Tabla 3 Tabla comparativa de picos y áreas de especies activas en las modificaciones de síntesis de Fc-CHIT.....	37
Tabla 4 Corrientes máximas en diferentes concentraciones de glucosa utilizando la síntesis de Fc-PLL (GOx) sobre carbón vítreo.....	46
Tabla 5 Corrientes máximas en diferentes concentraciones de glucosa utilizando la síntesis de Fc-CHIT (GOx) sobre NFC.....	47
Tabla 6 Tabla comparativa de picos y áreas de especies activas en las modificaciones de síntesis de Fc-PLL.....	48
Tabla 7 Tabla comparativa de síntesis de Fc-PLL vs otros trabajos.....	54
Tabla 8 Tabla comparativa de electrodo de Ag/AgCl vs otros trabajos.....	65

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Diagrama de composición química del sudor.....	12
Fig. 2 Sensor para monitoreo en sudor.....	14
Fig. 3 Principios generales para un biosensor.....	18
Fig. 4 Imagen descriptiva de fabricación de electrodo de nanofibras de carbono.....	28
Fig. 5 Biosensor de glucosa tipo parche.....	29
Fig. 6 Diagrama explicativo del funcionamiento del dispositivo sensor y de sus componentes.....	31
Fig. 7 Fotografías descriptivas de proceso de síntesis Fc-CHIT.....	32
Fig. 8 Voltamperometría cíclica a electrodo de Carbón vítreo con depósito de Fc-CHIT (1).....	33
Fig. 9 Voltamperometría cíclica a electrodo de Carbón vítreo con depósito de Fc-CHIT (2).....	34
Fig. 10 Voltamperometría cíclica a electrodo de Carbón vítreo con depósito de Fc-CHIT (3).....	35
Fig. 11 Voltamperometría cíclica a electrodo de Carbón vítreo con depósito de Fc-CHIT (4).....	36
Fig. 12 Voltamperometría cíclica comparativa de modificaciones de Fc-CHIT.....	37
Fig. 13 Voltamperometría cíclica Fc-CHIT con enzima y sin enzima.....	38
Fig. 14 Cronoamperometría a Fc-CHIT (GOx) depositado en carbón vítreo...	39
Fig. 15 Voltamperometría cíclica comparativa en carbón vítreo.....	39
Fig. 16 Voltamperometría cíclica de productos reservados en capas en carbón vítreo.....	41
Fig. 17 Voltamperometría cíclica comparativa en carbón vítreo.....	42
Fig. 18 Análisis de IR realizado a muestra de polímero redox.....	44
Fig. 19 Voltamperometría cíclica de GOx inmovilizada en Fc-PLL depositada sobre carbón vítreo.....	45
Fig. 20 Voltamperometría cíclica de GOx inmovilizada en Fc-PLL depositada sobre carbón vítreo.....	46
Fig. 21 Voltamperometría cíclica de GOx inmovilizada en Fc-PLL depositada sobre electrodo de NFC.....	48
Fig. 22 Cronoamperometría a Fc-PLL (GOx) depositado en NFC.....	49
Fig. 23 Concentraciones de glucosa vs promedio de corriente.....	50

Fig. 24 Fotografías de microscopio óptico electrónico de electrodos de Fc-PLL (GOx).....	51
Fig. 25 Concentraciones de glucosa vs promedio de corriente.....	52
Fig. 26 Concentraciones de glucosa vs promedio de corriente.....	53
Fig. 27 Amperometría a electrodo de Fc-PLL (GOx).....	55
Fig. 28 Estudio de interferentes de electrodo de Fc-PLL (GOx).....	56
Fig. 29 Fotografías de microscopio óptico electrónico de electrodos de Ag...	57
Fig. 30 Voltamperometría cíclica a electrodo de AgNP y AgCl en NFC.....	59
Fig. 31 OCP a Ag/AgCl comercial vs Ag/AgCl (Agar) en nanofibras de carbono.....	60
Fig. 32 Difractograma de Rayos X realizado a tinta de nanopartículas de plata	62
Fig. 33 Concentraciones de KCl vs promedio de voltaje obtenido por OCP...	62
Fig. 34 Concentraciones de KCl vs promedio de voltaje obtenido por OCP...	63
Fig. 35 Componentes de dispositivo electrónico.....	66
Fig. 36 Concentraciones de glucosa vs promedio de corriente.....	67

Dirección General de Bibliotecas UAG

ABREVIATURAS Y SIGLAS

A	Amperio
°C	grado centígrado
Cm	Centímetro
Ec.	Ecuación
Ln	logaritmo neperiano
Log	logaritmo base 10
M	Metro
Mg	Miligramo
MHz	mega Hertz
mL	mililitro (s)
Mm	Milímetro
mV	mili voltio
etc.	Etcétera
EV	electronvoltio
°F	grado Fahrenheit
Fig.	Figura
G	Gramo
H	Hora
Hz	Hertz
J	joule (s)
°K	grado Kelvin
Kg	kilogramo
KHz	kilo Hertz
L	Litro
Ppm	partes por millón
Seg	segundo
V	voltio
Vs	versus
μ	micra
μg	microgramo (s)
μm	micrómetro (s) (micras(s))
μl	micro litro (s)
Ω	ohmio
° ' " , ,	grados, minutos y segundos de arco
%	tanto por ciento
‰	tanto por mil

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Análisis de sudor y su vínculo a enfermedades

De acuerdo con Whitehouse (1935) el sudor es “un fluido corporal natural producido durante el ejercicio físico y estrés emocional y esencialmente es un filtro de plasma sanguíneo”. Es ligeramente ácido (pH de 4.0-6.8) y está compuesto en su mayoría por agua (99%), iones como sodio, cloro y potasio, también contiene pequeñas concentraciones de urea, lactato y piruvato, proteínas, péptidos, aminos, aminoácidos, esto de acuerdo con el trabajo de Mena-Bravo & Luque de Castro (2014). En la **Fig.1** se muestra un diagrama con la composición del sudor. Debido a la naturaleza acuosa del sudor, la mayoría de los compuestos identificados en este biofluido son polares, pero también se han identificado compuestos no polares o de polaridad intermedia (Delgado-Provedano et al., 2018).

Se han aislado sustancias adicionales que contribuyen a múltiples funciones del sudor (Hendricks et al., 2018), estas sustancias están ligadas a enfermedades o sirven para monitorear el estado fisiológico del ser humano. Como se explicó anteriormente, el sudor humano contiene diferentes tipos de sustancias iónicas, tal como se explica en el trabajo de Dam et al. (2016), entre ellas se encuentran sodio (Na^+), potasio (K^+) y cloro (Cl^-). También se pueden encontrar metabolitos, éstos son pequeñas moléculas de todas las células vivas que son intermediarios o productos finales de los caminos intermediadores del metabolismo, o que son utilizados como componentes de construcción de macromoléculas esenciales o que son convertidos en co-enzimas, tal como define Demain (1980).

Estos compuestos resultan útiles para la detección de enfermedades o para el monitoreo de la salud y bienestar del individuo. Un ejemplo de este tipo de aplicaciones es el presentado por Choi et al. (2017), que, al analizar la cantidad de cloruros contenida en el sudor, obtiene un marcador biológico para la detección de fibrosis quística. El cloruro también puede funcionar como marcador de pérdida de electrolitos durante la actividad física; la cantidad de bicarbonato de sodio dentro del sudor ayuda a la determinación del pH que puede utilizarse para la detección de enfermedades cutáneas (como dermatitis y acné) de acuerdo al trabajo de Curto et al. (2012); así mismo el volumen de sudor generado en actividades deportivas está directamente relacionado a la regulación del funcionamiento de las glándulas sudoríparas (Lee et al., 2016).

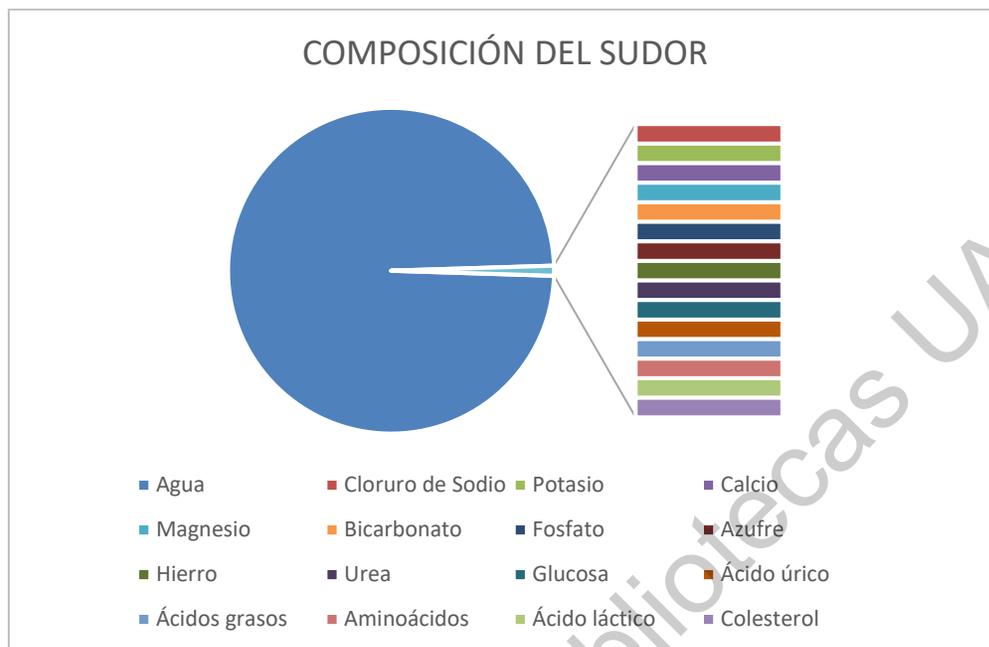


Fig. 1: Diagrama de composición química del sudor. Elaboración propia.

Las prácticas actuales de detección de metabolitos en el cuerpo son intrusivas, es decir, que requieren de perforaciones o introducción de algún objeto al cuerpo humano tales como agujas, esto implica el riesgo de infecciones para el paciente y la potencial transmisión de enfermedades para el operador. Estas prácticas requieren, en principio, la presencia de personal médico afirma Onor et al. (2017) en su trabajo. Asimismo, la detección actual se limita a conocer una sola sustancia en un dispositivo. Teniendo en cuenta esto, se suma la dificultad de la obtención de las señales que se pretenden analizar correspondientes a los metabolitos de interés, ya que las cantidades de éstos en el sudor se encuentran en orden micro molar.

Actualmente se han desarrollado técnicas y dispositivos enfocados al análisis, monitoreo y mejora de la salud; si bien varias de estas tecnologías tienen premisa intrusiva o requieren de una manipulación previa de la muestra a utilizar con dicho fin, existen proyectos como el de Zhang et al. (2015) en el cual se enfocan en utilizar biosensores no intrusivos, lo que hace el monitoreo de ciertos biomarcadores más cómodo para el individuo. En este proyecto se realiza un dispositivo utilizando la misma perspectiva: un dispositivo no intrusivo que permita el análisis de ciertos biomarcadores a través del sudor.

Uno de los objetivos de la química analítica es la sustentabilidad, ésta ha impulsado el desarrollo de diseños ecológicos, de herramientas de análisis para entregar de forma rápida y de bajo costo la información deseada (Cinti et al., 2018).

Inicialmente, los dispositivos de recolección de sudor, como el de Kintz & Samy (2000), consistían en un vendaje oclusivo conformado de capas de filtros de papel o piezas de algodón, gasas o toallas. Según Anatasova et al. (2017) uno de los mayores retos en deporte, ciencia del ejercicio y cuidado de la salud, es *“la necesidad de monitoreo continuo, no invasivo de biomarcadores para la evaluación del bienestar”*.

1.2 Técnicas de bioanálisis

Las técnicas micro/nanofluídicas se han convertido en una herramienta importante para análisis en una celda con la capacidad de integrar procedimientos experimentales que consumen tiempo y de trabajo intensivo en un dispositivo pequeño. Estas técnicas tienen ventaja sobre métodos convencionales en términos de menor volumen de muestra, cambio en tiempos, operaciones directas y procesamiento eficiente, como lo afirman Lin et al. (2018). Chen & Zhang (2018) dentro de su trabajo, aseguran que actualmente, se han aplicado chips microfluídicos en varios campos de la bioquímica tales como análisis de ADN, búsqueda de proteínas, separación celular y juega un rol importante en monitoreo ambiental, seguridad de alimentos, información tecnológica, etcétera.

También se han realizado estudios de este tipo de dispositivos para, por ejemplo, detectar bacterias diluidas en fluidos, como se explica en el trabajo de Wang et al. (2013). El acoplamiento de sensores potenciométricos para la determinación de especies aniónicas son atractivos para aplicaciones prácticas por su tamaño pequeño, fácil operación, portabilidad y bajo consumo de energía; este tipo de sensores han demostrado ser útiles para la determinación cuantitativa de diferentes sustancias (Gupta et al., 2009); un sensor utiliza medidas específicas de detección dado un analito en específico, esta reacción bioquímica producirá una señal como un cambio de color o un cambio en el potencial eléctrico.



Fig. 2 Sensor para monitoreo en sudor. **Fuente:** John Rogers/ Northwestern University, 2016.

Dentro de esta misma línea se han desarrollado biosensores que tienen la misma finalidad, entregar información relevante al diagnóstico en tiempo real sin la necesidad de infraestructura de laboratorio; la comunidad endocrinóloga, como en el trabajo desarrollado por Corrie et al. (2015) han procurado el desarrollo de biosensores destinados al monitoreo de glucosa para el cuidado de pacientes con diabetes. Trabajos recientes han demostrado que la repulsión anódica puede usarse como una poderosa herramienta de pre-concentración para detección de moléculas (ADN, proteínas, etc.), como se aprecia claramente en el trabajo desarrollado por Aízel et al. (2012).

El componente funcional del electrodo de referencia, Ag/AgCl, es conocido por sus propiedades de medición electroquímica, este sensor de cloro tiene un rol importante en otras áreas de aplicación, como se observa en el trabajo de Cranny et al. (2011). Menor costo y mayor resolución en tecnologías de impresión de pantallas para fabricar este tipo de sensores con arreglos micro-electro-mecánicos en sustratos piezoeléctricos flexibles de tecnología microTAS (Nordin et al., 2017). Electrodo iónico-selectivo miniaturizado, minimizan el volumen de muestra significativamente y por lo tanto habilitan el monitoreo en tiempo real del sudor mientras proveen comodidad a los usuarios (Dam et al., 2016).

Entre los analitos de mayor interés se encuentran la glucosa y los cloruros. La concentración de glucosa encontrada en el metabolismo está directamente relacionada a su uso como biomarcador para la detección y monitoreo de diabetes (enfermedad crónica en la cual el cuerpo no puede regular la cantidad de azúcar (glucosa) en la sangre). La diabetes es la primera causa de muerte en mujeres y la segunda en hombres en México según el Instituto Nacional de Salud Pública. Existen diferentes medidores de glucosa a nivel comercial, sin embargo, realizan las mediciones en sangre por lo que son tecnologías intrusivas. Existen diversos trabajos como el de Zhang et al. (2015) en el que utilizan métodos no invasivos que realizan la detección de glucosa en sudor a partir de enzimas.

De esta forma el análisis en la concentración de cloruros en el organismo se liga a la determinación de la fibrosis quística, si bien esta enfermedad se encuentra bien documentada, no se encuentran muchas fuentes referentes a las medidas actuales utilizadas para el análisis de esta. Personal médico recolecta muestras de sudor y se mandan a laboratorios especializados, sin embargo, es un proceso molesto para los pacientes sometidos al mismo. El análisis mediante sensores tipo parche como el de Choi et al. (2017) usando sensores potenciométricos, genera una nueva tecnología que permite evaluar estos niveles en tiempo real y con menor inconformidad de los pacientes sometidos a este tipo de procesos.

La integración de diferentes sensores dentro de un mismo dispositivo potencializa su uso como sensor de múltiples analitos en un solo proceso de análisis, lo que convierte a este tipo de dispositivos en una alternativa muy atractiva para su potencial aplicación en el campo de la medicina, así como la comodidad que se piensa proveer a los usuarios que deben someterse constantemente a este tipo de análisis.

1.3 De sensores, biosensores y dispositivos

Como se ha mencionado anteriormente existen diferentes electrodos que pueden utilizarse para llevar a cabo tareas de detección de diferentes metabolitos. Cuando se utiliza algún electrodo para estas actividades de reconocimiento se les llama sensores o biosensores dependiendo de su naturaleza. Así mismo existen diferentes tipos de elementos que pueden analizarse utilizando estos componentes de múltiples maneras, en este apartado se explican los tipos de componentes que se utilizan a lo largo del proyecto.

1.3.1 Sensores

Cuando se utiliza el término “sensor” se hace referencia a cualquier objeto, elemento o sustancia que tiene propiedades sensibles a alguna magnitud encontrada en un medio, y que al variar dicha magnitud se varía con cierta intensidad la propiedad de este objeto, elemento o sustancia. De acuerdo con la definición de Faraday (1834):

“Un electrodo es un conductor eléctrico utilizado para hacer contacto con una parte no metálica de un circuito, por ejemplo, un semiconductor, un electrolito, el vacío del grupo, un gas, etc. Es una celda electroquímica y hace referencia a cualquiera de los dos conceptos: ánodo (electrodo en el cual los electrones salen de la celda y ocurre la oxidación) y cátodo (electrodo en el cual los electrones entran a la celda y ocurre la reducción).”

Existen una infinidad de sensores que se pueden categorizar dependiendo de sus aplicaciones, características o propiedades. Sensores potenciométricos, de fuerza, encoders, membranas, piezoeléctricos, etc., son algunos de los ejemplos de sensores que se pueden encontrar. En este caso el sensor de interés es el sensor Potenciométrico; de acuerdo con la Real Academia de Ingeniería, un sensor potenciométrico es:

“Un sensor para la medida de los potenciales eléctricos en materiales o soluciones para calcular la concentración de disoluciones iónicas; consta

básicamente de tres elementos: dispositivo de medida de potencial, electrodo de referencia y electrodo selectivo a iones a caracterizar. La relación entre concentraciones y potenciales está definida por la ecuación de Nernst.”

Según Choi et al. (2017) el uso de medidas potenciométricas (en el análisis de concentraciones de especies iónicas) son consideradas técnicas analíticas bien establecidas que pueden ser fácilmente miniaturizadas. Así mismo se ha visto que este tipo de análisis son ampliamente utilizados debido a su precisión por lo que el uso de un sensor de este tipo es ideal para el objetivo del proyecto.

El análisis de iones de cloruro en cualquier solución recae en el equilibrio entre estos iones y el cloruro de plata ($AgCl(s) + e^- \leftrightarrow Cl^-(aq) + Ag(s)$), y puede ser cuantificado utilizando electrodos de Ag/AgCl, los cuales ya son muy comunes en la química analítica. Uno de los mayores retos es desarrollar este proceso en una escala miniaturizada y en un tipo específico de sensor que se desea desarrollar.

1.3.2 Biosensores

Un biosensor es un dispositivo integrado capaz de proveer información cuantitativa específica o semi-cuantitativa utilizando reconocimiento biológico de algún elemento, según la definición obtenida de Conlisk (2013), estos elementos pudieran ser: tejidos, microorganismos, enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc. De acuerdo con Buerk (1993) un analito presente en un medio externo debe ser capaz de entrar al biosensor, es decir que la membrana externa del biosensor deberá ser permeable al analito, esto puede ser observado en la **Fig. 3**, y si es posible, excluir otras especies químicas a las que el biosensor pudiera ser sensible. Para que este tipo de dispositivos funcionen el elemento biológico dentro del biosensor deberá interactuar con el analito y responder de alguna forma que pueda ser detectada por un transductor.

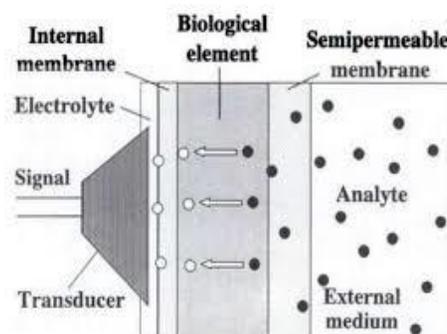


Fig. 2 Biosensor. **Fuente:** Buerk, D. G. (1993). Biosensors Theory and Applications. Taylor & Francis Group, CRC Press.

El uso de enzimas en este tipo de dispositivos como elemento de reconocimiento biológico dentro del biosensor ha sido muy utilizado a lo largo de los años por su excelente actividad química al ser expuesto a la sustancia de interés. Estos dispositivos se han popularizado debido a su adaptabilidad a diferentes medios, como agua, suelo, aire, alimentos e incluso fluidos humanos, lo cual los hacen ideales para casi cualquier necesidad, algunos trabajos como los de Shahar et al. (2019), Vukojević et al. (2018) y de Varmira et al. (2018) exponen algunos ejemplos de los diferentes campos en los que se pueden aplicar estos dispositivos.

En la *Tabla 1* se resumen algunos biosensores electroquímicos no invasivos reportados para la cuantificación de alguna sustancia en sudor. En esta tabla se explica también el tipo de técnica que utilizan los biosensores y que elemento utilizan para realizar el análisis, como se puede observar pueden ser elementos inertes altamente conductores (como el platino y el Ag/AgCl) o elementos enzimáticos (como el lactato oxidasa).

Tabla 1. Algunos sensores no invasivos para sudor reportados. Compilación propia.

Soporte	Elemento de reconocimiento	Técnica	Analito	Referencia
Algodón (ropa interior)	Carbón desnudo	Amperometría	B-nicotina, adenina dinucleótido y peróxido de hidrógeno	(Yang, 2010)
Polimida (mezcla de licra)	Ionforo de sodio	Potenciometría	Sodio	(Schazmann, 2010)
Hilo de algodón	Hidrógeno, amonio y ionforo de potasio	Potenciometría	pH, amonio y potasio	(Guinovart, 2013)
Poliéster	Ag/AgCl	Potenciometría	Cloruro	(Gonzalo-Ruiz, 2009)
Membrana de gas permeable	Platino	Amperometría	Oxígeno	(Mitsubayashi, 2003)
Estampa Elastómera	Carbón desnudo	Voltamperometría	Ácido úrico	(Windmiller, 2012)
Tatuaje temporal	Lactato oxidasa	Amperometría	Lactato	(Jia, 2013)

Tatuaje temporal	Polianilina	Potenciometría	pH	(Bandodkar, 2014)
Tatuaje temporal	Ionforo de amonio	Potenciometría	Amonio	(Guinovart, 2013)
Tatuaje temporal	Ionforo de sodio	Potenciometría	Sodio	(Bandodkar, 2014)
Parche para la piel de parileno	Lactato Oxidasa	Conductometría	Lactato	(Khodagholy, 2012)

Cuando se habla específicamente de los biosensores destinados a aplicaciones médicas (o que tendrán un contacto relativamente constante al cuerpo humano) una de las características que se debe buscar para la construcción de estos es que sea biocompatible.

Entre la literatura encontrada, el uso de la enzima glucosa oxidasa depositada en alguna superficie porosa, permite el análisis de una de las sustancias de interés de este proyecto: glucosa. Esto debido a que la enzima cataliza la oxidación de la glucosa, usar esta enzima como biosensor de glucosa es altamente recomendado y documentado, sin embargo, también se sugiere el uso de algún compuesto en el que la enzima esté inmovilizada para que sus capacidades de transferencia electrónica sean mejores, lo cual ayudaría a hacer estos biosensores más precisos. De los compuestos para mejorar las capacidades electroquímicas de diferentes enzimas se encuentran los llamados polímeros redox.

1.3.2.1 Polímeros redox

Para el caso de la construcción de biosensores, usualmente los diseños se realizan con grandes cantidades de la enzima para asegurar la actividad biocatalítica suficiente para su adecuado funcionamiento, así mismo se le provee a la enzima un ambiente favorable para mantener esta actividad por ciertos periodos de tiempo sin afectar la calidad de la información obtenida del mismo (Buerk, 1993). Para evitar el uso excesivo de las enzimas, se ha popularizado el uso de polímeros o mediadores redox, ya que estos compuestos pueden potencializar las capacidades conductoras de las enzimas para aprovechar mejor su reacción electroquímica. Un polímero redox, de acuerdo con Nochilson (2006), es definido como macromoléculas formadas por la unión, mediante enlaces covalentes, de uno o más monómeros.

Aunado a esto al aplicar un compuesto organometálico a un polímero redox, se pueden estudiar las reacciones electroquímicas que están ocurriendo en el biosensor. El ferroceno (Fc) es un compuesto organometálico que se ha catalogado como una opción altamente popular en el ámbito de desarrollo de biosensores debido a que cumple con la gran mayoría de los requerimientos necesarios para funcionar como mediador ideal en la catálisis enzimática redox (Palomera et al., 2011). Debido a la estructura del Fc (menor tamaño) es ideal para auxiliar la reacción redox de la GOx como se muestra en la **Fig. 3**. Al utilizar polímeros sintetizados con este compuesto se garantiza la adhesión del material sobre el electrodo base y la capacidad de reutilizar el material.

De acuerdo con Nilsson & Robinson (2016) la Poli-L-lisina (PLL) y poli-electrolitos parecidos usualmente son propuestos para la pasivación de superficies de conductores electrónicos “incompatibles” como metales y óxidos metálicos para aumentar su capacidad de biocompatibilidad. Múltiples tipos de células se unen firmemente y se esparcen en superficies sólidas en las que se ha adsorbido la PLL. Pocos materiales con buenas capacidades conductoras ofrecen una superficie aceptable para células o biomoléculas, sin embargo, al cubrir estas superficies con PLL aumenta la posibilidad de que estas especies biológicas interactúen (o ignoren) con la superficie como lo harían en su ambiente natural (Mazia et al., 1975).

2. HIPÓTESIS

El uso de materiales microporosos de carbono impregnados con materiales enzimáticos o inorgánicos en un dispositivo nanofluídico acoplado a un circuito electrónico y con una interfaz gráfica, permitirá la construcción de un biosensor flexible para la detección simple y rápida de metabolitos encontrados en el sudor como glucosa y cloruros.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Desarrollar un prototipo de un biosensor nanofluídico tipo parche acoplado a un circuito electrónico y una interfaz gráfica para la detección de cloruros y glucosa, utilizando electrodos de Ag/AgCl y glucosa oxidasa inmovilizada sobre superficies nanoporosas de carbono respectivamente.

3.2 Objetivos Particulares

- Optimizar las condiciones de reacción para la síntesis del polímero redox por métodos químicos no convencionales.
- Caracterizar el polímero redox por métodos fisicoquímicos mediante Espectrometría de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR), Resonancia magnética nuclear de carbón y protón y Espectroscopía de Fotoelectrones emitidos por Rayos X (XPS) y por métodos electroquímicos.
- Evaluar la enzima glucosa oxidasa con el polímero redox sobre nanofibras de carbono para su uso como biosensor de glucosa.
- Caracterizar electroquímicamente electrodos basados en nanopartículas de plata sobre nanofibras de carbono para su uso como sensor de cloruros.
- Diseñar y construir un circuito electrónico amplificador de señales micro amperométricas acoplado a un transductor para evaluación de señales de biosensor de glucosa y sensor de cloruros.
- Desarrollar una interfaz gráfica de fácil uso para la interpretación de resultados generados por los sensores y por el circuito integrado.
- Incorporar y evaluar los sensores de glucosa y cloruros en un biosensor dérmico.

4. METODOLOGÍA

Los reactivos utilizados fueron de alta pureza: Quitosano (bajo peso molecular), Ferroceno-ácido carboxílico (97%), ácido acético glacial ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$), Borohidruro de sodio (NaBH_4), N-Hidroxisuccinimida (98%) (NHS), N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (98%) (EDC), Solución de Poli-L-lisina (0.1% [w/v] en H_2O) y la tinta de Nanopartículas de plata (50 wt %, dispersión en etilenglicol) se obtuvieron de Sigma-Aldrich, todos los agentes se utilizaron sin realizarles mayor modificación. Para las soluciones salinas (PBS) a diferentes pH se utilizaron sales compradas de JT-Baker y estas mismas soluciones se prepararon en agua destilada.

El papel de nanofibras de carbono (NFC) Toray PTFE 060 tratado se obtuvo de Fuel Cell ®. Este papel es el utilizado para la construcción de la base de los electrodos.

4.1 Biosensor de glucosa

4.1.1 Síntesis Ferroceno-Quitosano

4.1.1.1 Modificación 1:

Para analizar el comportamiento del quitosano (CHIT) sintetizado con Ferroceno-ácido Carboxílico (Fc-COOH), se utilizó una metodología modificada a la descrita por Yilmz et al. (2012). A continuación, se describe la metodología que se siguió para esta primera parte.

Inicialmente se disolvió el Fc-COOH (0.18mM) en 15 mL de metanol, a esta disolución se le agregó Quitosano de bajo peso molecular (CHIT) (0.36mM) previamente disuelto en 15 mL de ácido acético (0.1M), se dejó en agitación durante 1 h y posteriormente se le agregaron 0.36mM de Borohidruro de sodio (NaBH_4) y se dejó en agitación durante 24 h. Posteriormente a esta solución se le agregaron aproximadamente 15 mL de una solución de hidróxido de Sodio (NaOH , 5%) obteniendo un precipitado. El precipitado obtenido fue filtrado y lavado con agua desionizada y metanol, después del lavado el producto se dejó secar durante 24 h al aire libre. Una vez secos los productos quedan con apariencia de hojuelas. Para la preparación de la tinta catalítica, se tomó una muestra de 3 mg y se diluyeron en una solución de Ácido acético al 1% wt.

Se utilizó una relación de 3mg de Fc-CHIT en 850 μL de Ácido acético, se tomaron 10 μL de Fc-CHIT y se depositaron sobre un electrodo de carbón vítreo previamente pulido a efecto espejo. Para realizar la caracterización electroquímica de este polímero, se realizaron pruebas de Voltamperometría cíclica (VC) en una

celda electroquímica con una solución de buffer de fosfatos (PBS) pH 7.4, así mismo para las pruebas se utilizó un alambre de platino como contra-electrodo y un electrodo de Calomel Saturado (SCE) como electrodo de referencia. Se utilizó una ventana de potencial de -0.1 a 5.0 V a una velocidad de 5 mVs⁻¹. A lo largo de los diferentes procesos de análisis se realizaron modificaciones a los mismos, por lo que en cada resultado mostrado se describen las condiciones bajo las que se realizó cada análisis.

4.1.1.2 Modificación 2:

Esta modificación consistió en la disolución del Fc en metanol (0.18mM en 15 mL) y posteriormente se le agregaron N-Hidroxisuccinimida (NHS) (0.27 mM) y N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcabodiimide hydrochloride (EDC) (0.54 mM) y se dejaron en agitación constante durante 4 h a temperatura ambiente. Concluido este tiempo se le agregó a la síntesis el CHIT en Ácido acético (0.36 mM en 15 mL) y se prosiguió con la metodología descrita en la primera modificación.

Después de 48 h de secado el producto obtenido, para diluir los mismos se utilizó Ácido acético (1% wt), utilizando una relación de 100 µL de ácido por cada miligramo de producto.

4.1.1.3 Modificación 3:

Se realizó una modificación en la estequiometría de la síntesis, se incrementó la cantidad de Fc al doble en relación molar, es decir, se aumentó la cantidad a 0.36 mM y se disolvió en 22.5 mL de metanol; las demás cantidades y la metodología se mantuvieron iguales. Para esta modificación una vez disueltos los productos (1 mg en 100 µL) se dejaron disolver durante 24 h con procesos de agitación vigorosa y sonicado al inicio y al final de las 24 h, después se realizó el depósito de los productos disueltos en el electrodo.

4.1.1.4 Modificación 4:

Como última modificación realizada a la síntesis se aumentaron las cantidades de NHS y de EDC a 0.54 mM y 1.06 mM respectivamente, con la finalidad de aumentar la probabilidad de activación del Fc y su unión con el CHIT. Cabe mencionar que al llegar a esta modificación se conservaron los cambios realizados a las modificaciones anteriores.

4.1.1.5 Inmovilización de GOx en Fc-CHIT

Para la inmovilización de la enzima se tomaron 0.15 mg de GOx (*Aspergillus niger*) y se disolvieron en 15 µL de PBS pH 7.4 con ciclos de agitación vigorosa, a ésta se le agregaron 2 µL de EDGE 7.5% y 35 µL de la síntesis de Fc-CHIT (3.5 mg en 35 µL de Ácido acético). Al igual que las pruebas realizadas a cada modificación,

se depositaron 10 μL de Fc-CHIT (GOx) en un electrodo de carbón vítreo y se dejó secar por 24 h.

4.1.2 Síntesis Ferroceno-(Poli-L-Lisina)

4.1.2.1 Modificación 1:

Se selecciona la Poli-L-Lisina (PLL) como sustituyente en la síntesis del CHIT, para esta síntesis se diluyó primero el Fc (78 mg, 0.36 mM) en metanol (22.5 mL) en agitación constante, a esta mezcla se le agregaron NHS (62.2 mg, 0.54 mM) y EDC (167 mg, 1.06 mM) y se dejó en agitación constante durante 4 h. Al finalizar este lapso se le agregó a la síntesis el polímero, PLL (10 mL) y se mantuvo en agitación durante 1 h, posterior a este tiempo se le agregó el NaBH_4 (0.36 mM) y se dejó en agitación constante por 48 h. Se llevó a cabo un lavado del precipitado obtenido con agua desionizada y metanol, con lo que se obtuvieron unos productos con consistencia tipo gel, mismos que se dejan secar por 24 h. Después del secado, se obtuvieron unos productos con apariencia de hojuelas, se tomaron muestras de 4 mg de los productos y cada muestra se puso a disolver en 400 μL de diferentes solventes: agua desionizada, metanol, acético (1% wt) y Ácido clorhídrico (HCl, 1% wt).

Todas las muestras se dejaron diluir durante 24 h con previos ciclos de agitación vigorosa y de sonicado entre cada agitación. Pasadas las 24 h se revisó cada solución y al no observar cambios se procedió a realizar otros ciclos de agitación y sonicado para forzar la disolución y se dejaron en sus respectivas soluciones durante otras 24 h. Se descarta el uso de las soluciones en agua desionizada y en metanol y se aumentan las concentraciones de HCl y de Ácido acético de forma progresiva hasta tener concentraciones de 70% de ácidos. Se realizan pruebas a las soluciones, aunque no estuvieran los productos completamente disueltos, así mismo se tomó una muestra de los productos que se habían conservado en metanol previo al secado y se realizó un depósito en forma de “capas” de los mismos para evaluar este producto.

4.1.2.2 Modificación 2:

Para la modificación de esta síntesis removió el NaBH_4 del proceso de síntesis. Después de agregar la PLL a la síntesis y dejarla en agitación se observó la nula formación de precipitados por lo que la síntesis es completamente líquida, de esta síntesis se toman 10 μL y se depositan en un electrodo de carbón vítreo; el restante de síntesis se dejó secar al aire hasta evaporar el metanol. Al dejar secar la síntesis durante 3 días y dejar el metanol evaporarse, se obtuvo una pasta de la

cual 3 mg se disolvieron en MeOH (30 μ L), esta disolución se utilizó para la inmovilización de la GOx de la misma forma que se describe con anterioridad.

4.1.3 Fabricación de los electrodos de nanofibras de carbono para su uso como biosensor de glucosa.

Para la fabricación de los electrodos de trabajo se seleccionó el papel Toray, éste es un papel hecho a base de fibras de carbono (NFC) con una superficie mesoporosa sobre la que se deposita el polímero y la superficie opuesta cuenta con propiedades hidrofóbicas. Para el electrodo (**Fig. 4**) como tal, se cortan tiras del papel de nanofibras de 5 mm x 1.5 cm, una vez cortadas a medidas, se procede a aislar parte de la misma tira con parafina, dejando los extremos de área de 0.25 cm² expuesta, uno de los extremos funcionará como área de depósito, mientras que el extremo contrario funcionará como área de conexión para realizar el análisis.



Fig. 4 Imagen descriptiva de fabricación de electrodo de nanofibras de carbono.

Una vez cortados y aislados los electrodos, se proceden a realizar depósitos de la GOx inmovilizada en el polímero para realizar el análisis correspondiente.

Para estos depósitos se siguió la misma metodología que las pruebas anteriores 15 μ L de GOx, 2 μ L de EDGE 7.5% y 30 μ L de Fc-PLL en metanol, de esta síntesis se tomaron 20 μ L que son los que se depositaron sobre la superficie del electrodo.

Este depósito se dejó secar por 24 h a temperatura ambiente. Posterior al secado se realizaron los análisis electroquímicos correspondientes.

4.1.4 Fabricación de electrodo de referencia y contra electrodo para construcción del biosensor de glucosa tipo parche

Para la fabricación de estos electrodos, se utilizó el mismo material (Toray) de NFC. Siguiendo el diseño de tiras, se fabricó el electrodo de Ag/AgCl, para este electrodo se utilizó una tinta de nanopartículas de plata con la que se cubrió la superficie del electrodo (área de depósito) y se dejó secar por 24 h. Transcurrido este tiempo se cubre esta superficie con una solución de FeCl_3 ($30 \mu\text{L}$) y se dejó actuar durante 30 minutos, posteriormente se lavó la solución con agua desionizada eliminando el excedente y se deja secar el electrodo durante 24 h. La **Fig. 5** muestra los tres electrodos fabricados para su posterior caracterización. Los resultados obtenidos por el análisis a este biosensor se presentan en el apartado de resultados y discusión.

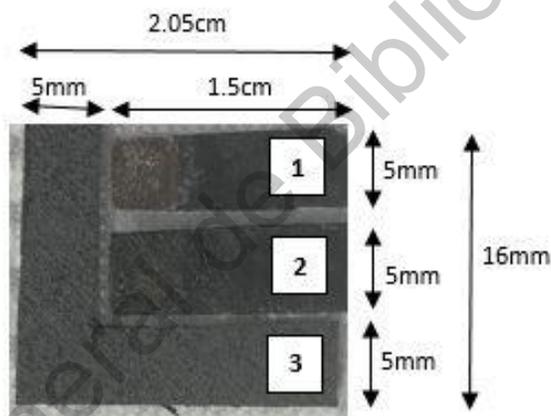


Fig. 5 Biosensor de glucosa tipo parche. 1) Electrodo de referencia de Ag/AgCl. 2) Electrodo de trabajo con depósito de Fc-PLL (GOx). 3) Contra electrodo de nanofibras de carbono sin aislante de parafina.

4.2 Sensor de Cloruros

Para la construcción del sensor de cloruros, se siguió la metodología anterior en la que se construyó un electrodo de Ag/AgCl, se deposita la tinta de nanopartículas de Ag en el electrodo de NFC previamente aislado con parafina, y se dejó secar por 24 h. Posteriormente se cubrió la superficie con una solución de FeCl_3 ($30 \mu\text{L}$) y se dejó durante 30 minutos, se lava el electrodo con agua desionizada eliminando el excedente y se deja secar el electrodo durante 24 h. De acuerdo con la literatura analizada se propuso el uso de agarosa como una especie de aislante de la capa de Ag/AgCl sin alterar la capacidad de análisis de esta.

Para este proceso se disolvieron 80 mg de agarosa en 2 mL de cloruro de potasio (KCl) (1 M), se procedió a calentar esta solución a 90°C hasta homogenizar la consistencia de esta. Esta solución se deja enfriar hasta aproximadamente 50°C, una vez alcanzada dicha temperatura, se tomaron 20 μ L de la misma y se depositaron sobre la superficie de Ag/AgCl del electrodo y se dejan secar a temperatura ambiente durante 24 h.

4.3 Dispositivo electrónico

Para la parte de integración de los electrodos a un sistema electrónico se utilizó un microcontrolador Arduino UNO con 14 “pines” digitales y 6 analógicos. Como convertidor de voltaje a corriente se utiliza un módulo MOD-V2C. Así como componentes misceláneos como resistencias de diferente capacidad, cables y caimanes para la conexión. Toda la programación se realizó en la interfaz de Arduino desde una computadora personal.

Se realiza una conexión del módulo MOD-V2C a la placa del Arduino, los pines de Vcc y GND del módulo se conectan a los pines del mismo nombre del microcontrolador, el pin OUT es el que generará la señal de corriente correspondiente al voltaje en los pines VIN y GND, este pin OUT se conecta al pin de entrada analógica 0 del Arduino para recibir la señal. Los electrodos se conectaron de la siguiente forma:

- Contra-electrodo (electrodo de NFC de mayor área superficial): a pin GND del módulo convertidor.
- Electrodo de referencia (electrodo de Ag/AgCl en NFC): a pin analógico 1 del microcontrolador.
- Electrodo de trabajo (electrodo de Fc-PLL (GOx) en NFC): a pin VIN del módulo convertidor.

Para pruebas iniciales para comprobar el funcionamiento del dispositivo se utiliza el biosensor de glucosa debido a su naturaleza voltamperométrica y como fuente de alimentación se utiliza el cable de carga del Arduino que va de esta placa a la computadora desde donde se cargará el programa. Este programa se desarrolló en lenguaje C en la interfaz de Arduino, dentro de éste se configuraron los pines del microcontrolador de acuerdo con su función dentro del dispositivo, es decir:

- Pin A0 (pin de entrada analógica 0) = entrada de la señal del electrodo de trabajo.
- Pin A1 (pin de entrada analógica 1) = entrada de la señal del electrodo de referencia.

Este programa en versión de prototipo se encargará de leer, almacenar y mostrar en el monitor las señales registradas.

En la **Fig. 6** se muestra un diagrama del funcionamiento resumido del dispositivo, para esto, el biosensor de glucosa genera una señal de voltaje, misma señal que se traslada al conversor para pasar esta señal a una señal analógica de corriente que puede compararse con los resultados del potenciómetro, esta señal convertida se lleva al microcontrolador, que en este caso es el Arduino, en esta parte la señal entra al programa en forma analógica, este programa se encarga de leerla, almacenarla y mostrarla en pantalla como resultado del análisis.



Fig. 6 Diagrama explicativo del funcionamiento del dispositivo sensor y de sus componentes.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Biosensor de glucosa

5.1.1 Síntesis de Fc-CHIT

5.1.1.1 Modificación 1

En la **Fig. 7** se muestran las fotografías tomadas durante cada etapa de la síntesis realizada con el quitosano y el ferroceno, desde la disolución del Fc en metanol, hasta los productos finales tal como se observa en la **Fig. 7 (4)** se obtienen unos productos con apariencia similar a la de unas hojuelas muy delgadas que se desprendieron del papel filtro sin necesidad de aplicación de calor, succión o raspado y que fácilmente se trituran y se obtenían unos polvos, estos productos en polvo son los que al final se disolvieron en una solución de Ácido acético para su posterior análisis.

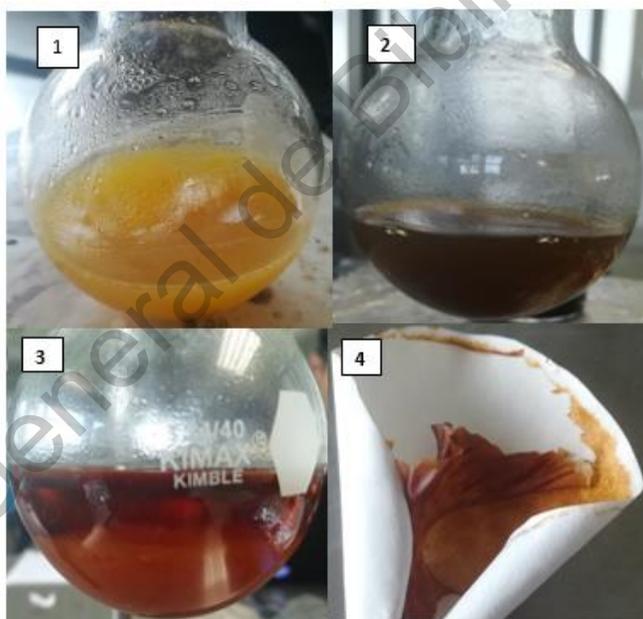


Fig. 7 Fotografías descriptivas de proceso de síntesis Fc-CHIT. 1) Ferroceno diluido. 2) Síntesis con CHIT y NaBH_4 después de 24 h. 3) Formación de precipitados al agregar NaOH . 4) Productos de síntesis después de lavado y 24 h de secado.

Durante el proceso de disolución de los productos (3 mg) se observó que se requirió mayor concentración de la solución de Ácido acético de la esperada debido a que no se lograba una consistencia de la disolución adecuada para depositarse sobre los electrodos. Para encontrar la relación apropiada se fue aumentando

paulatinamente la concentración de Ácido acético conforme se hacían las observaciones.

- 300 μL de Ácido acético= excesivamente espesa, difícil de manejar.
- 500 μL de Ácido acético= menos espesa, gelatinosa, igualmente difícil de manipular para depósito en electrodos.
- 850 μL de Ácido acético= consistencia de mucho menor espesor, ideal para su manipulación para depósito en electrodos de trabajo.

Como se muestra en la VC del polímero modificado con Fc depositado en el carbón vítreo (**Fig. 8**), únicamente se observa la corriente capacitiva del carbón, sin la presencia del par de picos característicos del Fc como lo reportan algunos autores (Nagarale et al. (2009), Yang et al. (2016), Zhuo et al. (2014), entre otros), lo cual sugiere que el CHIT no logró ser modificado por el Fc.

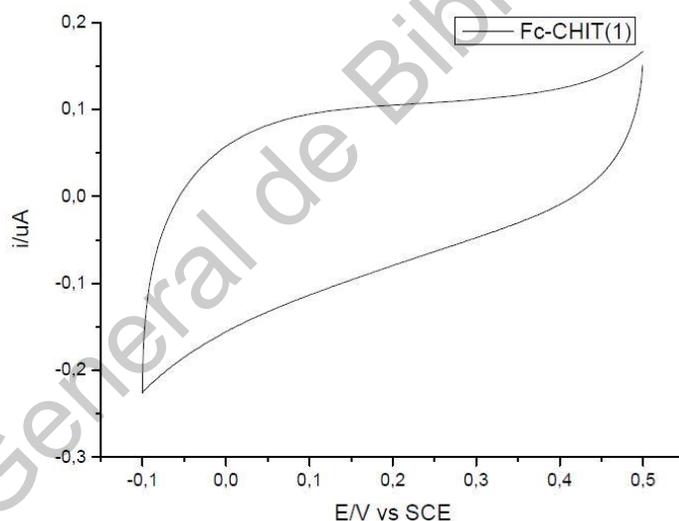


Fig. 8 Voltamperometría cíclica a electrodo de Carbón vítreo con depósito de Fc-CHIT (1) vs SCE en PBS pH 7.4. a 5 mVs^{-1} .

5.1.1.2 Modificación 2

Se propuso agregar NHS y EDC a la síntesis como elementos que pudieran promover el anclamiento del CHIT en el Fc tal como se describe en la metodología. En la VC de la **Fig. 9** se pueden observar un par de picos redox en 0.22 V y 0.15 V (vs SCE) que pudieran corresponder al ferroceno, no obstante, la corriente faradaica es de apenas $0.10 \mu\text{A}$, lo cual puede sugerir que la cantidad de Fc anclado al CHIT es limitada, para comprobar esto se realiza el cálculo del área de especies electroactivas (Γ) se calcula mediante la **Ec. 1**:

$$\Gamma = \frac{I}{nFQ} \dots\dots\dots \text{Ec. 1}$$

Donde n = número de electrones transferidos ($n=2$), $F= 96485.3365 \text{ C/mol}$, I = corriente generada y Q = corriente del área bajo la curva del voltamperograma. Para la modificación 2 se obtiene un cálculo de $0.263 \mu\text{A mol}^{-1}$. El resultado indica que con la adición de NHS y EDC se mejora la formación de un enlace entre el CHIT y Fc. Sin embargo, la corriente de los picos redox no es comparable a lo reportado por otros autores en trabajos mencionados a lo largo de este trabajo. Considerando este resultado y para mejorar la cantidad de Fc unido al CHIT se realizó una modificación en la estequiometría de la síntesis.

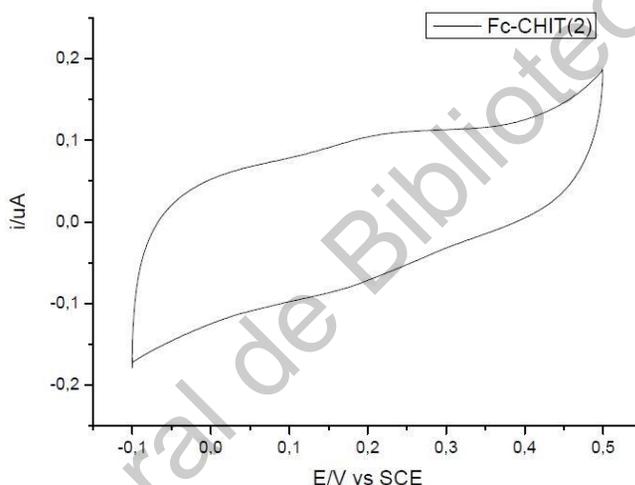


Fig. 9 Voltamperometría cíclica a electrodo de Carbón vítreo con depósito de Fc-CHIT (2) vs SCE en PBS pH 7.4. a 5 mVs^{-1} .

5.1.1.3 Modificación 3

Durante el proceso de síntesis de esta modificación realizada, no se apreció un cambio significativo en la apariencia o en la consistencia de los productos obtenidos, únicamente se aprecia un color ligeramente más oscuro. Cuando se estaba realizando la disolución de estos productos se comenzó a notar que, en las modificaciones en las síntesis anteriores, mismas que llevaban más tiempo en la solución de Ácido acético, la consistencia se había alterado, haciéndose más líquidas de lo que estaban al inicio de su disolución. Estas síntesis tenían un tiempo superior a 48 h de disolución.

Con esta modificación, el resultado en la VC (**Fig. 10**) es similar respecto a la modificación anterior, observando el par de picos redox en 0.23 V y 0.18 V (vs SCE) con una corriente de pico de oxidación de $0.12 \mu\text{A}$, con un área electroactiva de $0.274 \mu\text{A/mol}$. Con la modificación de la síntesis no se aprecia un cambio

significativo, por lo que para beneficiar la reacción y el anclamiento del Fc al CHIT se aumentaron las cantidades de NHS y de EDC al doble con las cantidades descritas previamente en la metodología.

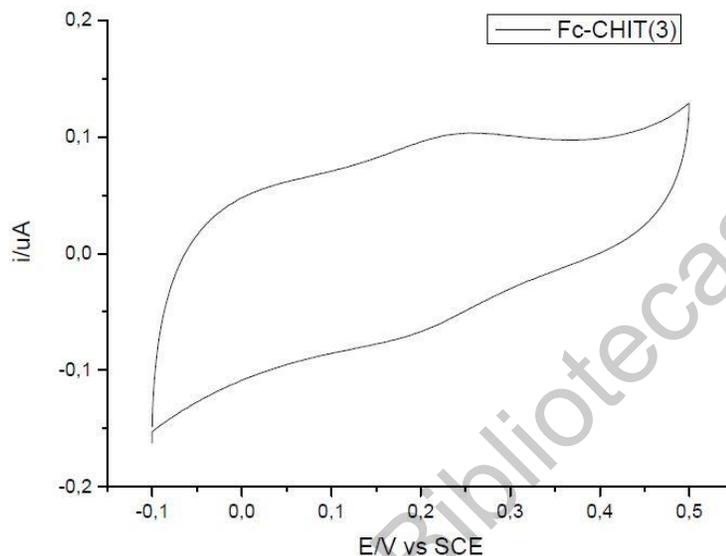


Fig. 10 Voltamperometría cíclica a electrodo de Carbón vítreo con depósito de Fc-CHIT (3) vs SCE en PBS pH 7.4. a 5 mVs^{-1} .

5.1.1.4 Modificación 4:

Al modificar la relación de cantidad de NHS y de EDC en la síntesis, se observó una mayor corriente para el par de picos de oxidación y reducción que se encuentran localizados en 0.2 V vs $0.345 \mu\text{A}$ y 0.14 V vs $-0.264 \mu\text{A}$ (vs SCE) respectivamente, mismos que se observan en el voltamperograma de la **Fig. 11**.

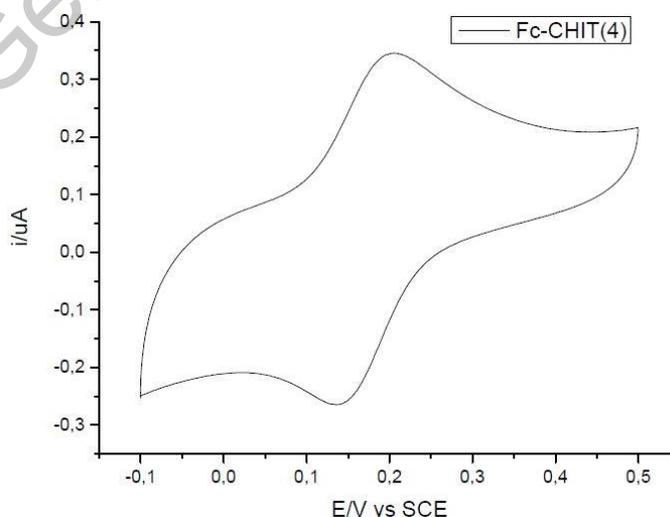


Fig. 11 Voltamperometría cíclica a electrodo de Carbón vítreo con depósito de Fc-CHIT (4) vs SCE en PBS pH 7.4. a 5 mVs^{-1} .

Este voltamperograma muestra resultados favorables para su uso por lo que se realiza una comparación entre los resultados obtenidos.

En la *Tabla 2* se muestra una comparativa general de cada modificación realizada, en esta misma se muestra la relación estequiométrica de cada compuesto utilizado en la síntesis, el tiempo que se llevó en cada etapa y la relación usada para disolver cada modificación, cabe mencionar que el disolvente fue siempre el mismo, una solución de Ácido acético 1%.

Como se observa en la misma tabla, para la primera modificación, el tiempo total necesario para obtener resultados fue de 50.5 h, para la segunda modificación se requirieron 54.5 h, para la tercera modificación 78 h, misma cantidad de tiempo necesaria para la cuarta modificación.

La cantidad de horas que fueron requeridas importa debido a que en general es un factor de alta importancia al proponer una síntesis para cualquier finalidad.

Tabla 2. Tabla comparativa de modificaciones de síntesis de Fc-CHIT.

<u>Mod.</u>	<u>Tiempo (Horas)</u> (Síntesis/Secado/Disolución)	<u>Estequiometría</u> (CHIT/Fc/NHS/EDC/NaBH ₄)	<u>Relación</u> Fc-CHIT/ácido acético
1	26/24/0.5	1/0.5/-/-/1	3 mg / 850 µL
2	30/24/0.5	1/1/0.75/1.5/1	1 mg / 100 µL
3	30/24/24	1/1/0.75/1.5/1	1 mg / 100 µL
4	30/24/24	1/1/1.5/3/1	1 mg / 100 µL

En la **Fig. 12** se muestra la VC comparativa de las diferentes modificaciones realizadas, en esta comprueba un funcionamiento electroquímico favorable de la última modificación, por lo que se procede a inmovilizar la enzima glucosa oxidasa (GOx) en la síntesis de Fc-CHIT (4).

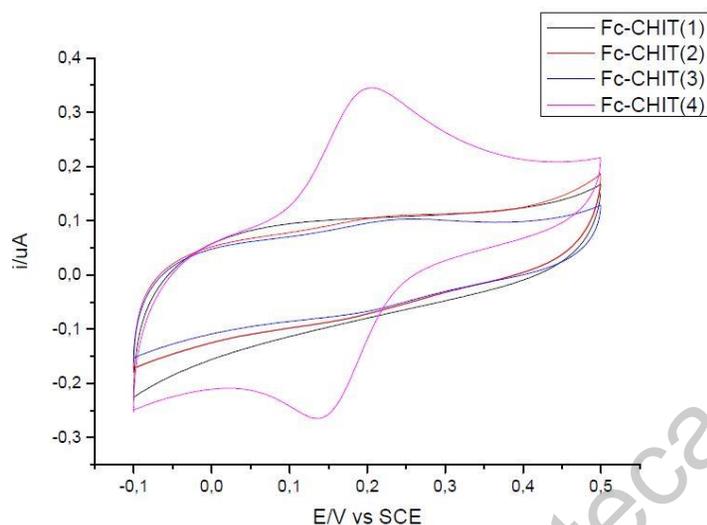


Fig. 12 Voltamperometría cíclica comparativa de modificaciones de Fc-CHIT vs SCE en PBS pH 7.4. a 5 mVs^{-1} .

Tabla 3. Tabla comparativa de picos y áreas de especies activas en las modificaciones de síntesis de Fc-CHIT.

Mod.	Pico Oxidación (E/V) / (i/μA)	Pico Reducción (E/V) / (i/μA)	Γ (μA* <i>mol</i>)
1	-	-	-
2	0.2153 / 0.107	0.13207 / -0.0916	0.263
3	0.2459 / 0.103	0.18744 / -0.0705	0.274
4	0.2032 / 0.345	0.13141 / -0.264	0.870

En la *Tabla 3* se muestran los picos de oxidación y de reducción de cada una de las modificaciones realizadas con el Ferroceno sintetizado con Quitosano, también se muestran los resultados obtenidos calculando el área de especies activas en cada una, en la misma se puede observar la mayor área de la modificación 4 de la síntesis porque lo que se puede concluir que se cumplió con lo propuesto al inicio de las modificaciones, aumentar la cantidad de Ferroceno anclado en el Quitosano para promover una mejor actividad electroquímica.

5.1.1.5 Inmovilización de GOx en Fc-CHIT

La **Fig. 13** corresponde a la VC comparativa de Fc-CHIT (4) y la enzima glucosa oxidasa inmovilizada en el mismo polímero, se observa que se mejoran las señales de la reacción redox obtenidas de la enzima inmovilizada en el polímero de forma muy visible y definida por lo que a partir de este resultado se realizan pruebas crono amperométricas.

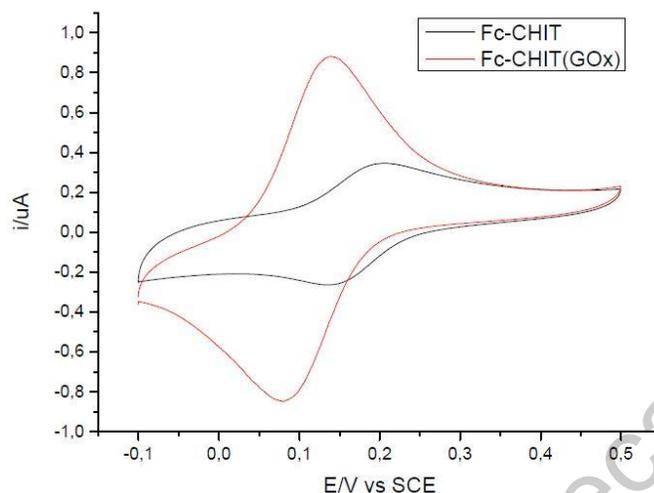


Fig. 13 Voltamperometría cíclica Fc-CHIT con enzima (rojo) y sin enzima (negro) depositado en carbón vítreo vs SCE en PBS pH 7.4 a 5 mVs^{-1} .

Se realizaron pruebas amperométricas a 165 mV (vs SCE) con adiciones de 1 mM de glucosa en la celda electroquímica en agitación constante, así mismo para estas pruebas el Fc-CHIT tenía más de 48 h diluyéndose en Ácido acético y, como se había mencionado anteriormente, se nota un cambio en la consistencia de los productos haciéndose más líquidos.

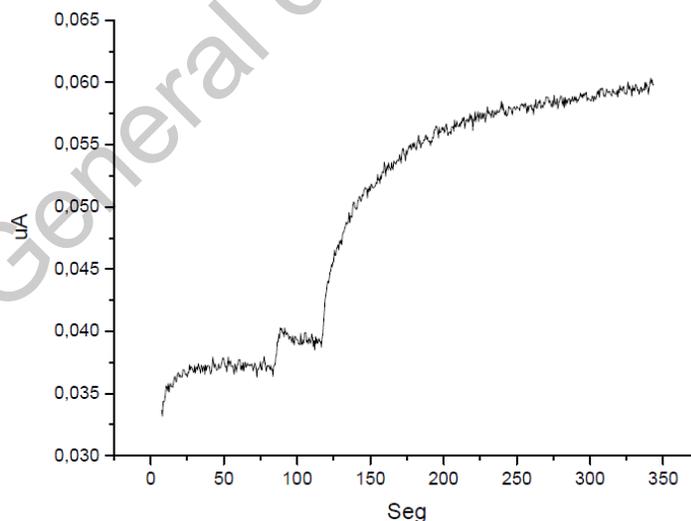


Fig. 14 Cronoamperometría a Fc-CHIT (GOx) depositado en carbón vítreo vs SCE en PBS pH 7.4 a 165 mV con variaciones de GLU en agitación.

Al observar el comportamiento en la cronoamperometría en la **Fig. 14** se pueden diferenciar las primeras adiciones de glucosa y una creciente muy marcada en la segunda adición, es decir de 20 nA en comparación al de 5 nA del primero, sin embargo este crecimiento no se estabiliza, no es constante y a pesar de seguir

aumentando la concentración de glucosa en la solución prueba ya no se aprecian cambios notorios, por lo que se decide realizar una nueva prueba de VC al polímero con la enzima para comprobar éste comportamiento del polímero.

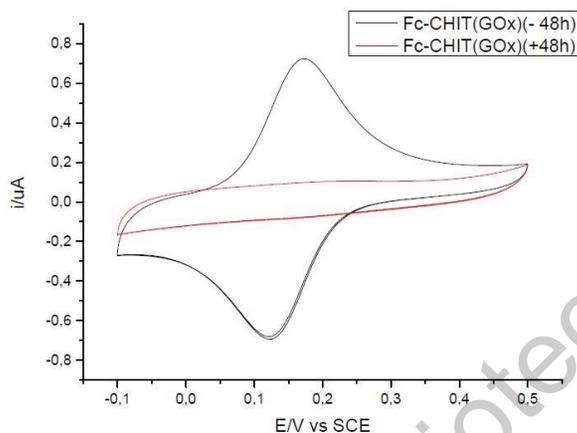


Fig. 15 Voltamperometría cíclica comparativa en carbono vítreo vs SCE en PBS pH 7.4. a 5 mVs⁻¹. Rojo: GOx inmovilizada en Fc-CHIT recién diluido en Ácido acético. Negro: GOx inmovilizada en Fc-CHIT con más de 48 h diluido.

En la **Fig. 15** se observa la repetición de la prueba de VC realizada al mismo polímero con diferentes tiempos de disolución, en este resultado comparativo se hace muy marcado que en el análisis se perdió completamente la capacidad de reacción electroquímica del polímero, ambas pruebas se realizaron por triplicado para confirmar este resultado, sin embargo, no hubo respuesta con el aumento de la concentración de glucosa. Así mismo se observaron los electrodos de carbono vítreo posterior a su análisis de VC con un vidrio de aumento para apreciar la capa superficial y en ambos se encontraba depositado el polímero, lo que indica que en los resultados no fue que el material se desprendiera del mismo electrodo, sino una especie de generación de hidrólisis del quitosano dentro de la solución de Ácido acético después de 48 h de ser expuesto a la misma, lo cual podría explicar la pérdida total de las capacidades electroquímicas del mismo en la síntesis con el ferroceno.

Estos resultados son peculiares debido a que la capacidad de transferencia de electrones del polímero era excelente y con alta reversibilidad, mismas características que se fueron perdiendo entre mayor tiempo pasaba el polímero redox en la solución, con estos resultados se procede a realizar un análisis de todo lo concluido de este polímero.

Al observar los resultados obtenidos y tomando en cuenta diferentes aspectos, como el hecho de que el tiempo de síntesis de todas las modificaciones

fuera tan elevado (mayor a 50 horas en total), la difícil disolución del polímero en la solución de Ácido acético, el corto tiempo de vida útil del polímero una vez que se comienza el proceso de disolución, lo que se traduce directamente en que se tiene que preparar cada electrodo prácticamente al momento en que se planea realizar el análisis, tanto las VC de calibración como las pruebas amperométricas en diferentes concentraciones de glucosa, todo esto se resume en una única conclusión que es el cambio del quitosano por algún otro polímero de menor complejidad estructural recomendado para sintetizarse con el Ferroceno y que tenga mayor estabilidad para su posterior uso para inmovilizar la GOx en el mismo para su uso en un biosensor de glucosa.

5.1.2 Síntesis de Fc-PLL

5.1.2.1 Modificación 1

Después de analizar los resultados obtenidos con el quitosano, se llegó a la conclusión de reemplazar el polímero por otro, Polí-L-Lisina (PLL).

Al realizar la síntesis, después de las primeras 24 h de agitación, se observó una ligera formación de precipitados sin agregar el NaOH, por lo que se decide dejar la síntesis en agitación por otras 24 h haciendo un total de agitación por 48 h. En este punto se observa una formación importante de precipitados, que serán utilizados como el producto a analizar posterior a su lavado. Las pruebas se realizaron bajo las mismas condiciones que las utilizadas para las síntesis anteriores, esto para tener un punto comparativo entre las mismas y entre los trabajos realizados por otros autores.

De acuerdo con lo explicado en la metodología la primera modificación realizada con este nuevo polímero no se pudo disolver, por lo cual se realizaron pruebas con depósitos del producto en forma de capas, con picos de oxidación y reducción en 0.25 V vs 26.91 μ A y en 0.19 V vs -0.19 μ A (vs SCE) respectivamente.

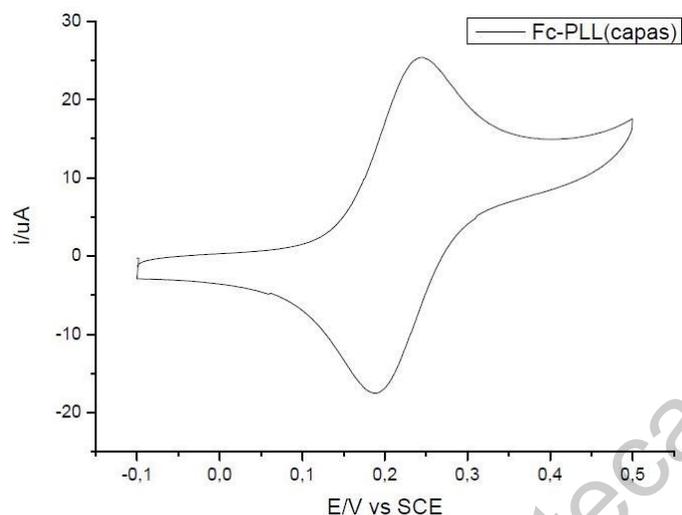


Fig. 16 Voltamperometría cíclica de productos reservados en capas en carbón vítreo vs SCE en PBS pH 7.4. a 20 mVs^{-1} .

En los voltamperogramas obtenidos de los productos en soluciones ácidas a diferentes concentraciones, que anteriormente se intentaron disolver en diferentes soluciones debido a que no se sabe en qué son solubles, no hay actividad electroquímica de los productos semi-disueltos en las soluciones los picos de oxidación y reducción que se aprecian en la gráfica de la izquierda de la **Fig. 17** se sospecha, pertenecen a un conjunto de partículas de productos que quedaron dispersos en el electrodo.

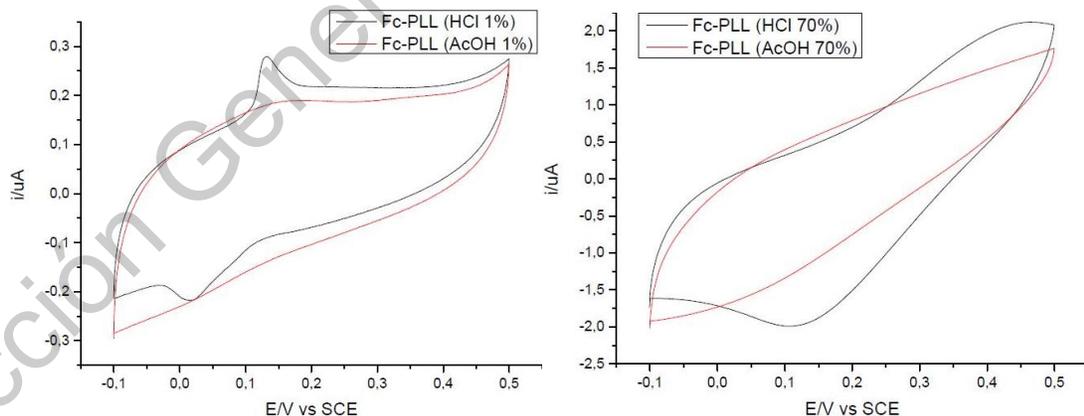


Fig. 17 Voltamperometría cíclica comparativa en carbón vítreo vs SCE en PBS pH 7.4. -0.1 a 0.5 V. Izquierda: Síntesis Fc-PLL en soluciones de HCl y Ácido acético 1% a 5 mVs^{-1} . Derecha: Síntesis de Fc-PLL en soluciones de HCl y Ácido acético 70% a 20 mVs^{-1} .

Así mismo al analizar los productos depositados en forma de capas (producto húmedo reservado depositado sobre la superficie del electrodo) se obtienen resultados electroquímicos favorables, mismos observados en la **Fig. 16** el

problema con utilizar el polímero de ésta forma en específico para el desarrollo de este análisis es que todo el producto que se había depositado sobre la superficie del electrodo se desprendió de la misma, esto debido a que los productos no son posibles disolver en las soluciones elegidas. Debido a estos resultados se propuso en realizar una modificación a esta síntesis, de tal forma que los productos que se obtengan al final de esta sean solubles o que tengan una consistencia más maleable y que sea de fácil uso como depósito en los electrodos para poder realizar un análisis correcto de la misma, sin sufrir pérdidas del material.

5.1.2.2 Modificación 2:

En esta modificación después del secado y de obtener una pasta se le realizaron pruebas de solubilidad, se utilizaron (como se describe en la metodología) agua desionizada y metanol, la pasta no se disolvió en el agua desionizada, sin embargo se disolvió muy fácil en el metanol por lo que se le realiza un lavado con agua desionizada y posteriormente con metanol, se obtiene el producto lavado y se deja secar una segunda vez durante 24 h para obtener la síntesis ya limpia. De este segundo lavado se obtienen productos con consistencia de pasta que se diluye fácilmente en MeOH por lo que se toma este producto final para utilizarse como síntesis prueba de este polímero.

A este polímero se le realizaron pruebas de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) para determinar que la PLL y el Ferroceno estuvieran unidos. En la **Fig. 18** se encuentran los resultados encontrados.

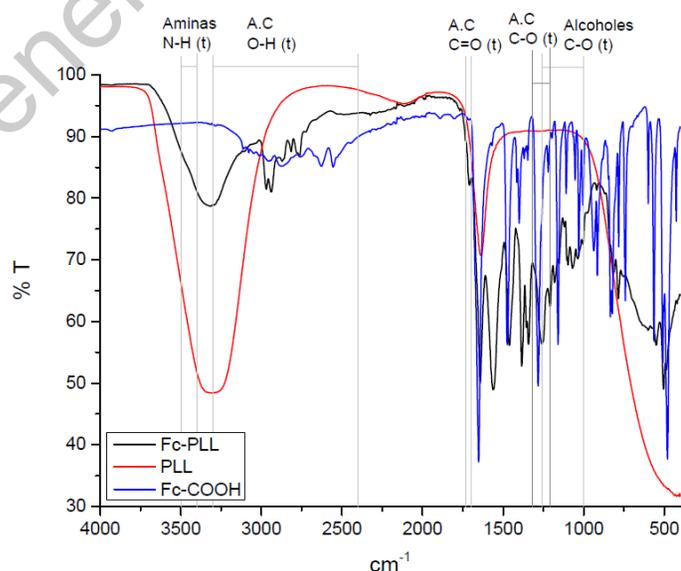


Fig. 18 Análisis de IR realizado a muestra de polímero redox Fc-PLL (negro), a polímero PLL (rojo) y a Ferroceno ácido carboxílico (azul).

En los resultados se pueden observar las curvas características de cada uno de los componentes del polímero redox, así mismo se puede apreciar que el polímero sintetizado tiene los picos característicos del Fc y de la PLL en su análisis, esto quiere decir que efectivamente se encuentran unidos en dicha solución. En la **Fig. 18** se encuentran marcados algunos elementos importantes encontrados en el polímero, tales como alcoholes (disolución de ferroceno) y de aminas (encontradas en la PLL).

Al analizar la **Fig. 19** se aprecian los picos de la reacción redox muy bien definidos, así mismo se observa una buena reversibilidad en la reacción, es decir que se obtienen la misma cantidad de electrones en el proceso de oxidación que en el proceso de reducción, esto se aprecia al ver que ambos picos están equidistantes del potencial medio de la reacción. A partir de estos resultados se realiza el análisis del comportamiento del electrodo de trabajo con la presencia de diferentes concentraciones de glucosa en la solución base.

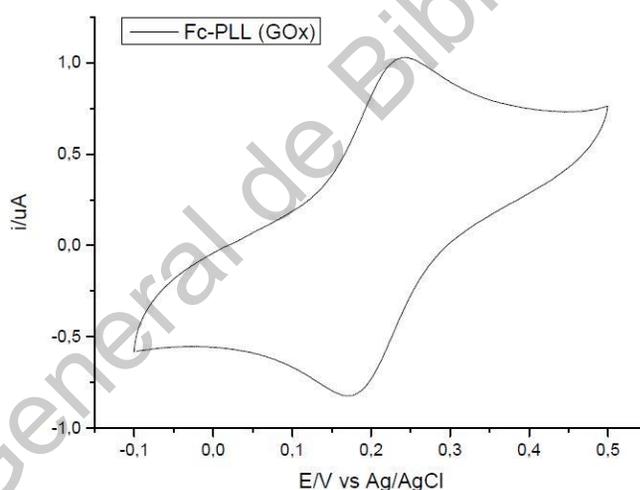


Fig. 19 Voltamperometría cíclica de GOx inmovilizada en Fc-PLL depositada sobre carbón vítreo vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4. a 20 mVs⁻¹.

En la *Tabla 4* se muestran los resultados obtenidos de corrientes máximas en las diferentes concentraciones de glucosa, en esta tabla y al analizar los resultados obtenidos en la VC de la **Fig. 20** se observa que existe un aumento de la corriente máxima de la reacción redox en cada aumento de la concentración de glucosa en la celda electroquímica. El cambio más notorio se aprecia cuando la concentración de glucosa en la solución pasa de 0 a 25 mM, los aumentos posteriores de glucosa no tienen el mismo nivel de crecimiento, aunado a esto, al llegar a la concentración máxima analizada, que es de 75 mM, disminuye la corriente máxima, al retirar el electrodo de carbón vítreo de la solución se observó que el material depositado se ha lavado parcialmente de la superficie del electrodo,

lo cual muestra la razón del comportamiento de las corrientes en cada concentración de glucosa.

Tabla 4. Corrientes máximas a diferentes concentraciones de glucosa utilizando la síntesis de Fc-PLL (GOx) sobre carbón vítreo.

Glucosa (mM)	Corriente máxima (i/ μ A)
0	0.44
25	0.77
50	0.65
75	0.62

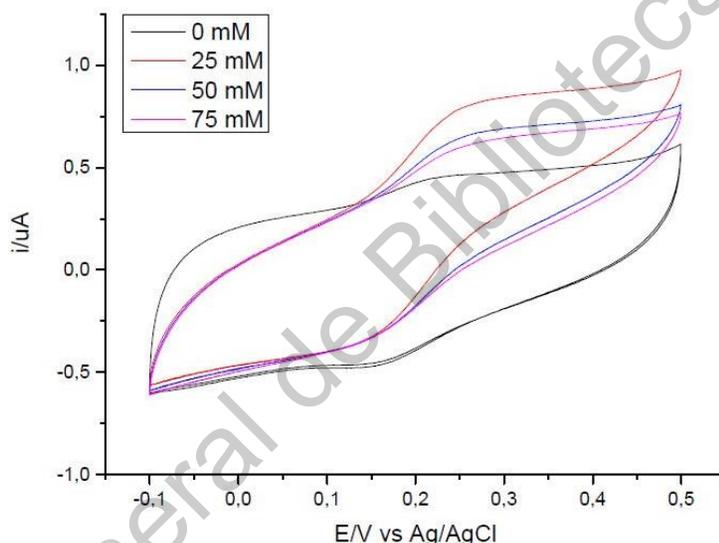


Fig. 20 Voltamperometría cíclica de GOx inmovilizada en Fc-PLL depositada sobre carbón vítreo vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 20 mVs⁻¹, con diferentes concentraciones de glucosa.

Con este resultado, se propuso cambiar el electrodo utilizado (carbón vítreo) por alguna superficie porosa para el depósito del polímero con la enzima con la finalidad de aumentar la corriente generada por la síntesis, favorecer el transporte de masa y la conductividad, además de construir un electrodo flexible que funcione como biosensor en un diseño tipo parche. Entre las propuestas de materiales a utilizar como soporte del polímero se propuso el uso de una superficie hecha con base de fibras de carbono, esto debido a la fácil absorción y a las capacidades de transferencia de señales electroquímicas del carbono que se han reportado por diferentes autores (Munje et al. (2017), Vukojevic et al. (2018) y Zhang et al. (2017)). Un papel hecho a base de este elemento es el Toray el cual, como se explica anteriormente tiene una parte hidrofóbica lo que puede proporcionar un material con un área de trabajo bien delimitada, lo que ayuda a su estandarización posterior.

5.1.3 Electrodo de nanofibras de carbono (NFC)

Una vez contruidos los electrodos de Toray como se explica en la metodología, se procedió a realizar pruebas electroquímicas para comprobar que la superficie del electrodo en el que se estaban realizando las pruebas, no era la ideal para la adhesión del polímero, también para realizar las primeras pruebas del electrodo de trabajo con diseño tipo parche para su futura aplicación.

Estas pruebas se realizaron bajo las mismas condiciones que las anteriores realizadas a Fc-PLL.

La **Fig. 21** muestra los voltamperogramas obtenidos a partir del análisis de uno de los electrodos de carbono fabricados, con el depósito de GOx inmovilizada en la síntesis de Fc-PLL a diferentes concentraciones de glucosa, las corrientes máximas se muestran en la *Tabla 5*, estas corrientes se muestran considerablemente mayores comparado con lo obtenido anteriormente (diferencia de 0.79 μA en 0 mM), a partir de estos voltamperogramas se puede apreciar una excelente actividad por parte del electrodo de trabajo fabricado, este análisis se realizó usando el electrodo de trabajo (fabricado), un contra electrodo de carbón (comercial) y un electrodo de referencia de Ag/AgCl (comercial).

Al igual que para el análisis realizado para la síntesis de Fc-CHIT, se hace un análisis de las áreas de especies electroactivas de las modificaciones de la síntesis de Fc-PLL.

Tabla 5. Corrientes máximas en diferentes concentraciones de glucosa utilizando la síntesis de Fc-PLL (GOx) sobre NFC.

Glucosa (mM)	Corriente máxima ($i/\mu\text{A}$)
0	1.23
5	5.28
10	11.45
25	45.79
40	60.82

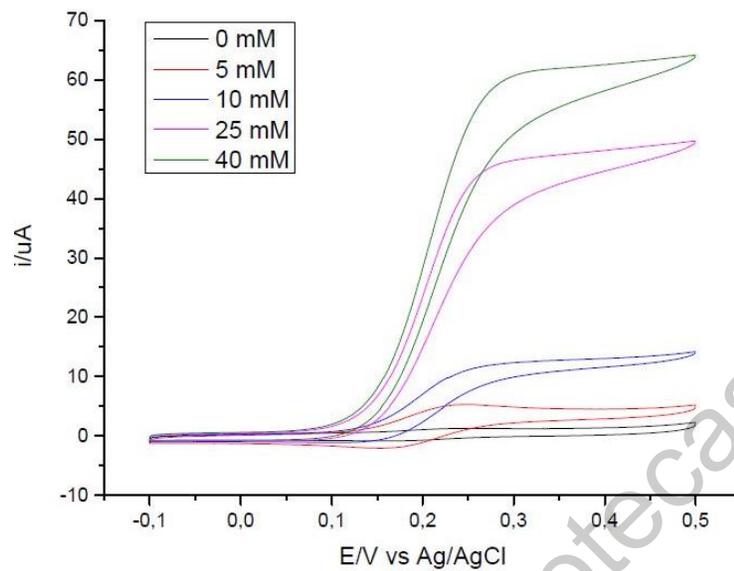


Fig. 21 Voltamperometría cíclica de GOx inmovilizada en Fc-PLL depositada sobre electrodo de NFC vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4. a 20 mVs^{-1} , con diferentes concentraciones de glucosa.

En la *Tabla 6* se muestran los resultados obtenidos para la primera modificación de la síntesis que se midió depositada en forma de capas sobre un electrodo de carbón vítreo, los resultados obtenidos de la segunda modificación diluida en metanol depositada sobre un electrodo de carbón vítreo y como último resultado aparece la segunda modificación, pero ahora depositada sobre el electrodo de NFC.

Tabla 6. Tabla comparativa de picos y áreas de especies activas en las modificaciones de síntesis de Fc-PLL.

Mod.	Pico Oxidación (E/V) / (i/μA)	Pico Reducción (E/V) / (i/μA)	Γ (μA*mol)
1 (Capas)	0.2470 / 26.914	0.18881 / -18.543	1.611
2	0.2423 / 1.039	0.17509 / -0.849	1.926
2 (NFC)	0.2433 / 1.236	0.18012 / -0.775	4.735

A partir de los resultados que se obtuvieron de los voltamperogramas y del análisis de las áreas, se deciden realizar pruebas cronoamperométricas para obtener un estudio detallado y establecer los parámetros del biosensor de Fc-PLL (GOx) depositado en nanofibras de carbono. Al observar el aumento de corriente de entre 1 y 2 μA con cada aumento de glucosa en la solución como se muestra en la **Fig. 22** y que los aumentos de corriente se registran en concentraciones pequeñas, se decide que este polímero, con la GOx inmovilizada tiene un gran potencial para su uso como el biosensor de glucosa de este proyecto. Así mismo en la **Fig. 23** se

observan los resultados estadísticos de las pruebas realizadas en tres electrodos del mismo depósito.

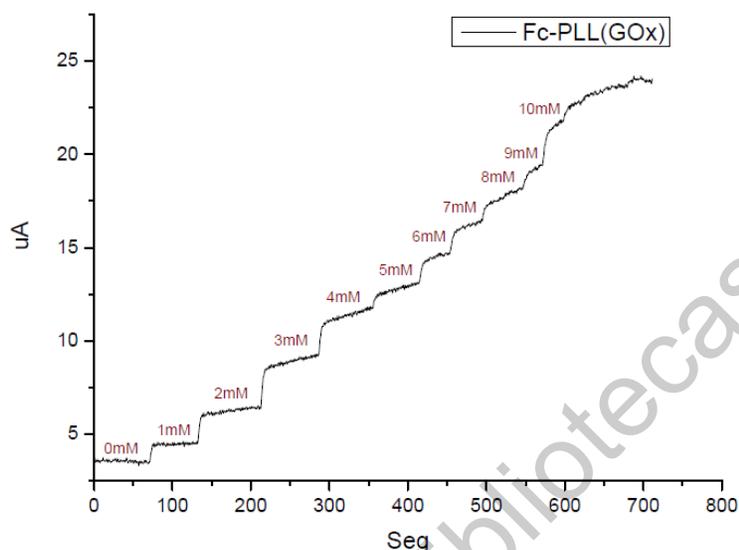


Fig. 22 Cronoamperometría a Fc-PLL (GOx) depositado en electrodo de NFC vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 360 mV con variaciones de GLU en agitación.

Estos resultados muestran un buen nivel de reproducción en los electrodos, es decir, que las corrientes obtenidas por diferentes electrodos de trabajo construidos bajo las mismas condiciones y el comportamiento que tuvo cada uno de los electrodos analizados es comparable con los demás, esto ayuda a corroborar que la enzima inmovilizada en el polímero trabaja de la misma forma y complementa los resultados previos obtenidos respecto al buen trabajo del Fc-PLL en el electrodo de nanofibras de carbono.

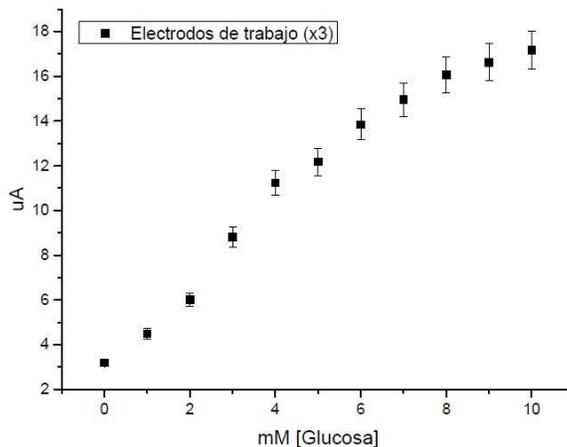


Fig. 23 Concentraciones de glucosa vs promedio de corriente obtenida por cronoamperometría de tres electrodos de trabajo de Fc-PLL (GOx) depositado en electrodos de NFC vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 360 mV en agitación.

Posterior a estos resultados, se tomaron fotografías en un microscopio óptico de alta resolución para observar si los electrodos de trabajo tuvieron alguna modificación, estas fotos se muestran en la **Fig. 24**, en la fotografía 1 se observan claramente las dos partes del electrodo: del lado izquierdo (color amarillo semi brillante) el área de trabajo con el depósito de Fc-PLL (GOx) y del lado derecho (gris opaco) el área aislada con parafina, la fotografía 2 muestra el área de separación del electrodo a una escala más pequeña (1 mm), ambas fotografías fueron obtenidas del electrodo previo al uso del mismo, es decir, se tomaron antes de que se le realizaran pruebas electroquímicas.

Después de hacer el análisis electroquímico al electrodo se tomaron las fotografías 3 y 4; en la fotografía 3 se aprecia el área de separación (trabajo y aislada) y en la fotografía 4 se muestra únicamente el área de trabajo, entre las observaciones realizadas se aprecia una opacidad significativa del depósito hecho en el área de trabajo, de igual forma, se observa que previo a su uso, el depósito se aprecia entre las fibras de carbono del electrodo, sin embargo posterior al análisis, el depósito queda como una única capa superficial en el área de trabajo, lo que indica una diseminación del depósito total realizado.

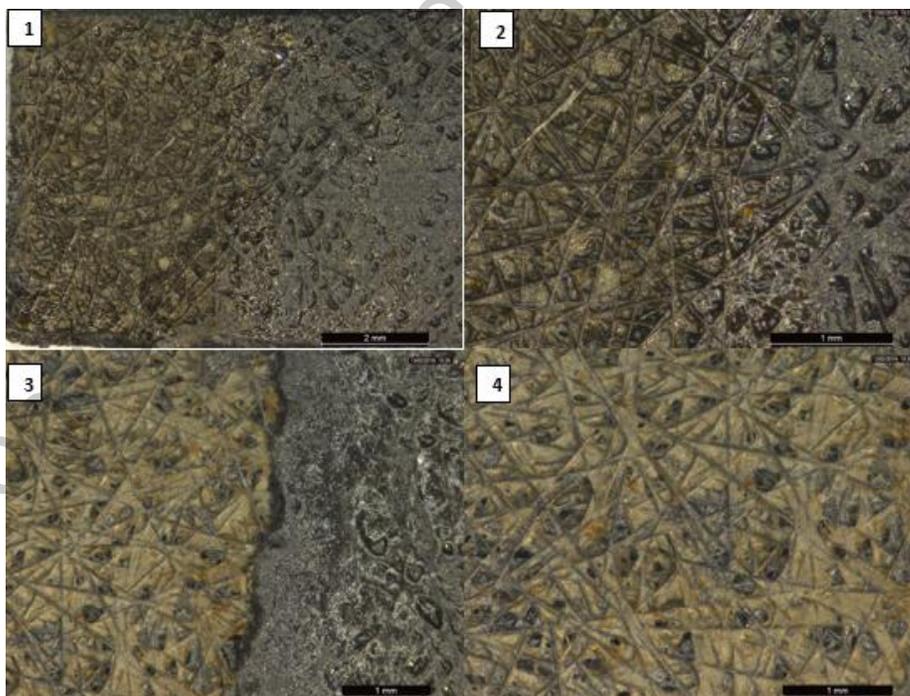


Fig. 24 Fotografías de microscopio óptico electrónico de electrodos de Fc-PLL (GOx). 1) Fotografía a escala 2 mm tomada previo al uso del electrodo. 2) Fotografía a escala 1 mm tomada previo al uso del electrodo. 3) Fotografía a escala 1 mm tomada posterior al uso del electrodo. 4) Fotografía a escala 1 mm tomada posterior al uso del electrodo.

A partir de los resultados obtenidos se procedió a realizar las pruebas con el electrodo de trabajo de nanofibras de carbono con depósito de Fc-PLL (GOx), electrodo de referencia de Ag/AgCl fabricado en papel de nanofibras de carbono y contra electrodo fabricado del mismo papel, tal como se explica en la metodología, a este tipo de electrodos se les llamará como electrodos tipo parche. Las pruebas que se hicieron se realizaron bajo las mismas condiciones de pH y de variación en las concentraciones de glucosa, con la única modificación de en lugar de continuar haciendo las pruebas en agitación, se realizan en estático debido a que hay que aproximar los análisis a las condiciones reales esperadas al realizar las mismas en el parche en sudor. En la **Fig. 25** se observa que la corriente en general disminuyó durante el análisis, este fenómeno se concluye que se presenta debido a la forma en que se realizó el análisis, es decir, al quitar la agitación de las pruebas y realizarlas de forma estática, el fenómeno de difusión en la superficie de los electrodos se reduce debido a que no hay nada que desplace la glucosa de la solución a través de la misma para fomentar la detección de la misma, sin embargo, se aprecia una reproducibilidad deseable y un promedio de corrientes comparable con otros trabajos.

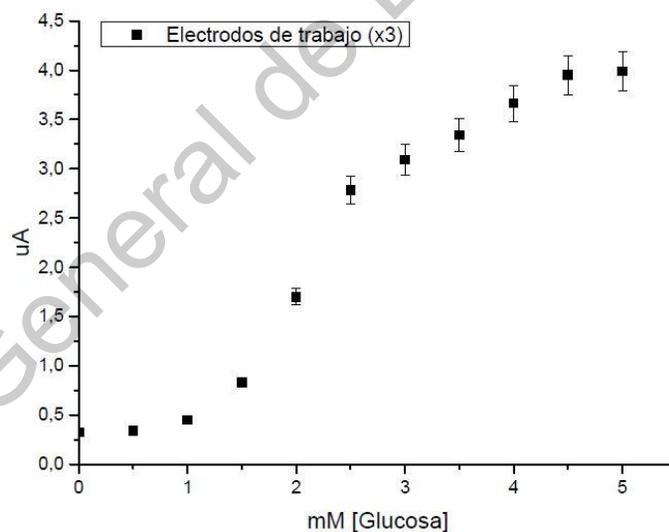


Fig. 25 Concentraciones de glucosa vs promedio de corriente obtenida por cronoamperometría de tres electrodos de trabajo de Fc-PLL (GOx) depositado en electrodos de NFC vs Ag/AgCl (fabricado) en PBS pH 7.4 a 360 mV en estático. Corrientes tomadas a los 30 segundos.

Así mismo se realiza una última serie de modificaciones a las pruebas, en este caso, se realiza un cambio en el pH de la solución, se pasa de un pH 7.4 a un pH 5.6, ya que éste último es comparable al pH del sudor humano, lo cual hace la última aproximación a las condiciones reales esperadas. El comportamiento de esta gráfica se puede explicar mediante la ecuación $y = 0.001x - 0.0005mA$ con una

$R^2 = 0.9731$. Las corrientes obtenidas al modificar el pH no tuvieron variaciones extremas respecto a las obtenidas con los análisis realizados a pH 7.4, estos resultados se muestran en la **Fig. 26**, estos resultados muestran una estabilidad relativa del polímero y resultados prometedores para su aplicación en análisis sobre humanos.

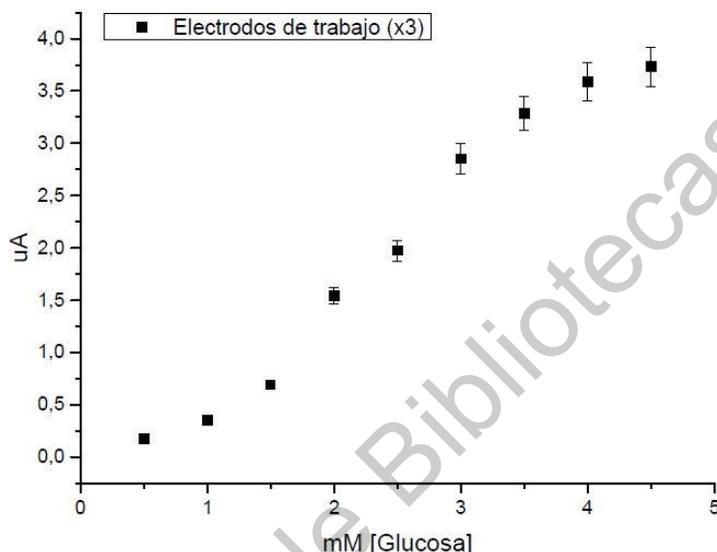


Fig. 26 Concentraciones de glucosa vs promedio de corriente obtenida por cronoamperometría de tres electrodos de trabajo de Fc-PLL (GOx) depositado en electrodos de NFC vs Ag/AgCl (fabricado) en PBS pH 5.6 a 360 mV en estático. Corrientes tomadas a los 30 segundos.

Entre los análisis correspondientes se deben realizar una serie de cálculos estadísticos obtenidos de los promedios de las cronoamperometrías realizadas, entre estos cálculos se obtienen los límites de detección, cuantificación y entre los más importantes la sensibilidad obtenida del electrodo para realizar su análisis.

En la *Tabla 7* se muestran los cálculos de límite de detección, límites de cuantificación, la constante de Michaelis-Menten (que corresponde a la descripción de la cinética enzimática y sirve para caracterizarla) y la corriente máxima obtenida por este trabajo con la síntesis de Fc-PLL (GOx) y de trabajos de otros autores en los que se describen el comportamiento de diferentes materiales, pero todos con el mismo objetivo: sensor de glucosa.

Entre los resultados que se pueden observar es que el límite de detección (cantidad mínima de glucosa detectable por el sistema) tiene resultados favorables y que compiten contra otros materiales utilizados por otros autores, lo que le da una confianza al sistema en general desarrollado por esta investigación.

Tabla 7. Tabla comparativa de síntesis de Fc-PLL vs otros trabajos.

<i>R</i>	<i>pH</i>	<i>Especie</i>	<i>LQ</i>	<i>LOD</i>	<i>Sensibilidad</i>	<i>K(mM)</i>	<i>I_{max}</i>
Este	5,6	Fc-PLL GOx	1.34 mM	0.4 mM	4 $\mu\text{A}/\text{mM cm}^2$	5.25	1.6 μA
	7,4	Fc-PLL GOx	0.095 mM	0.0285 mM	3.6 $\mu\text{A}/\text{mM cm}^2$	5.9	2.4 μA
	7,4	Fc-PLL GOx	0.145 mM	0.114 mM	5.95 $\mu\text{A}/\text{mM cm}^2$	6.7	27.8 μA
[36]	8	Óxido de Zinc		0.1 mg/dL	14.5 $\mu\text{A}/\text{mM cm}^2$		
[50]	7,4	GOx y nafi3n	0.72 mM/l	0.05 mmol/l	56.32 $\mu\text{A}/\text{mM cm}^2$		
[58]		NT cobre		0.2 mM			
[59]	7,4	NTC, CHIT, oro y GOx		0.1 mg/dL	26.6 $\mu\text{A}/\text{mM cm}^2$		
[26]	7,4	GOx CNT	66 μM	20 μM	$(3.2) \times 10^2 \mu\text{A}/\text{M}$	4.5	4.15 μA
[45]	7,4	Pt y GOx		60 μM	$(2.5) \times 10^2 \mu\text{A}/\text{M}$	38	17.2 μA
[11]	7,4	Magnetita y GOx		0.3 mM	$(32 \pm 4) \mu\text{A}/\text{M}$	18	0.67 μA
[57]	7,4	NP Pt		30 μM	684 nA/mM mm ²		
[44]	8-13	Grafito con NP Cu		0.44 μM	1467.5 $\mu\text{A}/\text{mM cm}^2$		

**R*=referencia, *LQ*=límite de cuantificación, *LOD*=límite de detección, *K*=constante Michaelis-Menten, *I_{max}*=corriente máxima, *R. L.*=rango lineal

Aunado a estos resultados, se realizó un análisis amperométrico en el que se analiza el efecto de diferentes sustancias presentes en sudor que podrían modificar el comportamiento del polímero, este estudio de interferentes se realizó contra electrodos comerciales ya que su objetivo es la caracterización únicamente de la enzima inmovilizada en el polímero, estos resultados se observan en las **Fig. 27 y 28**. Este análisis es primordial para la finalidad del biosensor de glucosa, ya que, como se mencionó anteriormente, en el sudor no sólo se encuentra glucosa sino que también, diferentes electrolitos que pueden modificar la medición del analito interés. Entre las sustancias que pueden interferir se encuentran el ácido úrico (UA), el ácido ascórbico (AA) y la dopamina (DA), de acuerdo con la literatura analizada, las concentraciones aproximadas de estas sustancias en el sudor son 0.2 mM de UA, 0.05 mM de DA y 0.01 mM de AA. Sin embargo, se espera muy poca o nula interferencia en el análisis debido a la alta selectividad de la enzima y a que estas sustancias no poseen estructuras que similares a la de la glucosa o que puedan interferir con la misma.

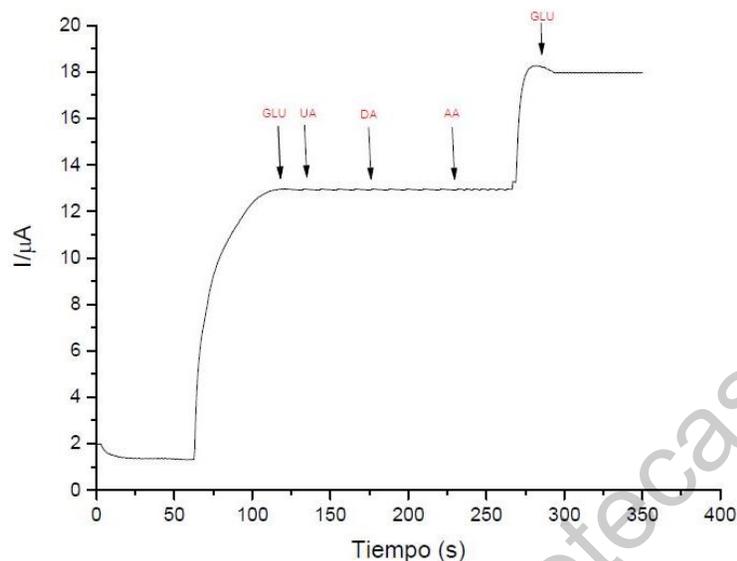


Fig. 27 Amperometría a electrodo de Fc-PLL (GOx) vs Ag/AgCl en PBS pH 5.6 a 210 mV. Adiciones de GLU (25 mM), UA (0.2 mM), DA (0.05 mM), AA (0.001 mM) y GLU (50 mM).

En los resultados obtenidos se puede observar que no se muestra una señal significativa de los interferentes si se compara contra la señal de 25 mM de GLU, esto indica que el electrodo tiene buena selectividad hacia las moléculas de glucosa presentes en una muestra similar al sudor. Esta alta selectividad se debe principalmente a que la enzima (GOx) únicamente oxida la glucosa y ninguna de estas sustancias tiene una estructura similar a la glucosa que pudiera generar alguna interferencia. En principio se eligieron estas sustancias como interferentes debido a que en lo reportado son los mayores interferentes utilizando otras especies de detección, sin embargo, eso no considero una diferencia en la especie utilizada en este trabajo.

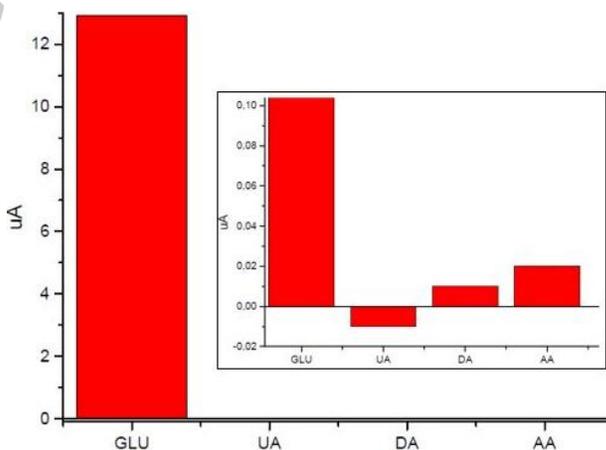


Fig. 28 Estudio de interferentes de electrodo de Fc-PLL (GOx) vs Ag/AgCl en PBS pH 5.6 a 210 mV. Adiciones de GLU (25 mM), UA (0.2 mM), DA (0.05 mM), AA (0.001 mM) y GLU (50 mM).

5.2 Sensor de Cloruros

Como primer análisis se tomaron fotografías en microscopio óptico de las primeras dos etapas del electrodo, es decir, de la tinta de nanopartículas de plata depositadas en el electrodo y posteriormente fotos de la capa de Ag/AgCl de este, estas fotografías se muestran en la **Fig. 29**. En la **Fig. 29** 1 y 3 se aprecian la separación entre el área de trabajo (área del depósito de Ag y Ag/AgCl respectivamente) y el área aislada con parafina.

Las imágenes 1 y 2, pertenecientes a las tomadas de las partículas de Ag, se aprecia hasta una tonalidad casi azul debido a la presencia saturada y seca de la plata, las cuales al ser expuestas a la solución de FeCl_3 se obtienen las fotografías 3 y 4, en las que se puede observar una capa superficial de un color morado y al fondo de esta capa superficial y entre las fibras del electrodo se alcanzan a distinguir destellos de la tinta de plata, lo cual puede comprobar la formación de una capa superior de un compuesto diferente respecto a lo depositado en capas inferiores del mismo electrodo.

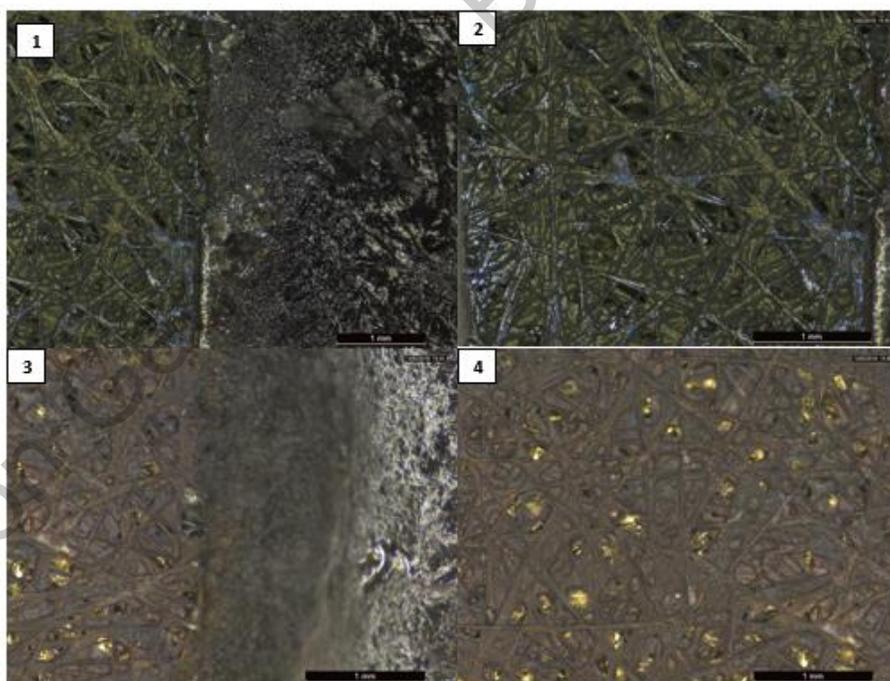


Fig. 29 Fotografías de microscopio óptico electrónico de electrodos de Ag. 1) Fotografía a escala 1 mm de tinta de Ag. 2) Fotografía a escala 1 mm de tinta de Ag. 3) Fotografía a escala 1 mm de Ag/AgCl. 4) Fotografía a escala 1 mm de Ag/AgCl.

Primeramente, se realiza la obtención de los perfiles electroquímicos de ambos electrodos, el de nanopartículas de Plata (AgNP) y del de Ag/AgCl. En la

Fig. 30 se muestran los voltamperogramas obtenidos, se considera una ventana de potencial de -1.5 a 1 V la cual de acuerdo con Innocenti et al. (2014), tiene el tamaño ideal para mostrar los procesos de oxidación y de reducción. Se puede observar que el pico de reducción para AgNP (-0.55 V vs -110 mA) es muy similar al de AgCl (-0.6 V vs -111 mA), sin embargo ambos difieren a lo reportado en el artículo de Innocenti et al. (2014), esto se puede deber a múltiples factores, entre los principales se concluye la diferencia en el tipo de depósito de plata utilizado, en este trabajo se utilizan la tinta de nanopartículas y en lo reportado se realiza un electro depósito de plata sobre el electrodo de carbón vítreo, también influye la diferencia de pH utilizado en ambos análisis, debido a la influencia del mismo en la actividad de la plata.

Ambos electrodos probados, muestran resultados muy similares, sin embargo, el de AgCl tiene un pequeño pico en 0.1 V vs -20 mA (vs Ag/AgCl), este pico se puede deber a la presencia de cloruros en la capa superficial del electrodo, así como el hecho de que la parte superior del voltamperograma, es decir la parte perteneciente a la oxidación se nota ligeramente con mayor carga que la del electrodo de AgNP, que se concluye se debe a la misma razón. En general se concluye que la tinta adquirida es realmente de nanopartículas de plata (50 wt %, dispersión en etilenglicol) y que al ponerse en contacto con la solución de FeCl₃ se produce un cambio superficial en el electrodo lo que permite confirmar la presencia de AgCl en el mismo.

Asimismo en el trabajo reportado por Choi et al. (2011), se muestra el voltamperograma de una masa de plata en un electrodo, este análisis lo realizan en PBS y muestra picos ensanchados que pueden indicar reacciones redox de mayor complejidad que suceden en la superficie del electrodo que también pueden involucrar óxidos de plata, usando también este trabajo como apoyo comparativo, se puede observar que existen una gran cantidad de factores que pueden alterar el comportamiento de las nanopartículas de plata, por lo que la caracterización individual de cada electrodo es necesaria para poder obtener un cálculo preciso de las diferentes concentraciones de analitos (cloruros en el caso de este trabajo) que van detectando estos electrodos a lo largo de un análisis.

Los resultados de la voltamperometría cíclica mostrados en la **Fig. 30** son similares a los obtenidos por Oje et al. (2018), en su trabajo se muestran los resultados de electro depósitos de plata en los que los picos de oxidación y reducción aparecen en voltajes cercanos a los mostrados en este trabajo (0.4 V y -0.5 V respectivamente), asimismo la VC muestra los picos obtenidos debido a reacciones faradaicas, esto implica en cierta forma que la capacitancia asociada a

la forma de depósito de la plata en los electrodos de NFC son de naturaleza pseudocapacitiva, también se toma en cuenta que el pico en el lado anódico pertenece a la oxidación de la Ag en la presencia de iones de cloruro. Los resultados obtenidos por este trabajo siguen siendo altamente similares en posiciones y definición a los de Oje et al. (2018), lo que coteja el análisis realizado previamente en el que se comprueba la naturaleza de las nanopartículas utilizadas en los electrodos analizados.

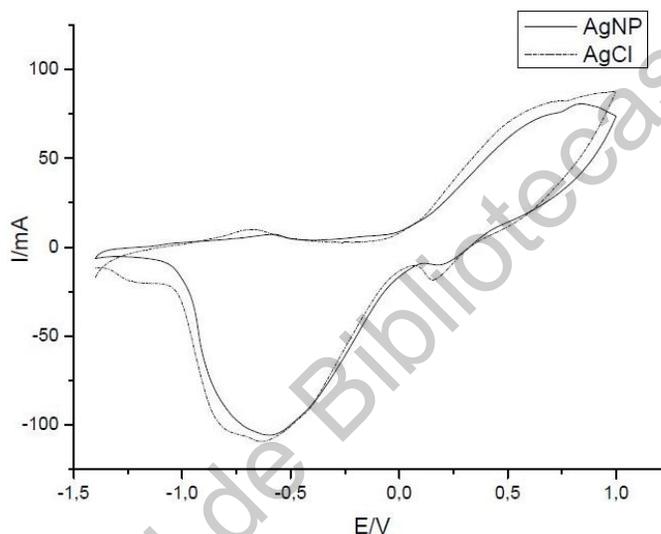


Fig. 30 Voltamperometría cíclica a electrodo de AgNP y AgCl en NFC vs Ag/AgCl (comercial) en solución de KOH 0.1 M, a 50 mVs^{-1} sin agitación

Para la caracterización electroquímica de este sensor se realizan pruebas de potencial a circuito abierto (OCP, por sus siglas en inglés) en la que se mide el potencial obtenido por las diferentes concentraciones de cloruros de potasio (KCl) medidos en soluciones de PBS a pH 7,4 y 5,6. Para este tipo de pruebas sólo se utilizan 2 electrodos, el electrodo de trabajo siendo un electrodo de Ag/AgCl comercial y el contra electrodo siendo el electrodo de Ag/AgCl con la capa de agar en el papel de nanofibras de carbono.

La **Fig. 31** pertenece al análisis de OCP del electrodo de Ag/AgCl con Agar, en esta figura se puede apreciar a simple vista el aumento de voltaje que se genera en el sistema con cada adición de KCl a la solución prueba. En la adición de 10 mM se puede apreciar un aumento en el voltaje que al corto tiempo disminuye y posteriormente se estabiliza, sin embargo, este fenómeno no se presenta de nuevo en las adiciones de KCl posteriores, por lo cual se plantea que esa variación en el comportamiento se debe a algún error durante el análisis.

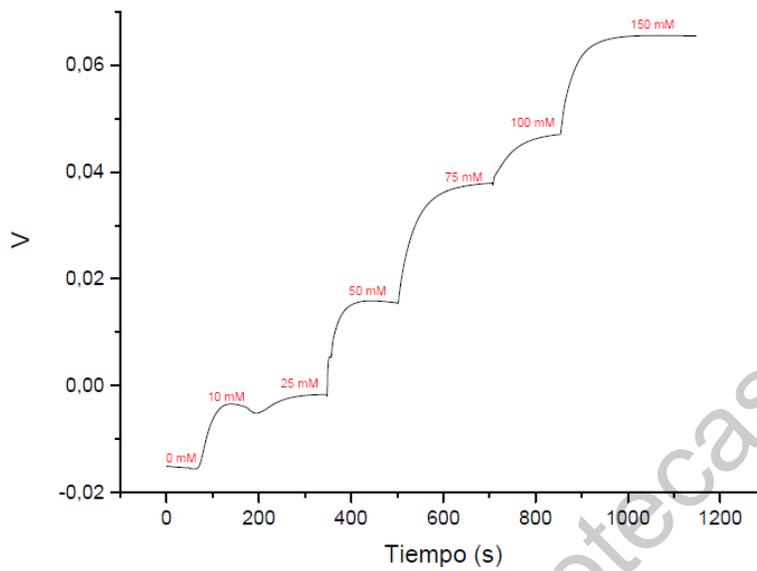


Fig. 31 OCP a Ag/AgCl comercial vs Ag/AgCl (Agar) en nanofibras de carbono en PBS pH 7.4 con variaciones de KCl.

Para este tipo de análisis se realiza la Ecuación de Nernst, esta ecuación se utiliza para calcular el potencial de reducción de un electrodo fuera de las condiciones estándar, es decir, esta ecuación se utiliza para realizar análisis predictivos del electrodo dentro de una solución problema, este comportamiento se describe de la siguiente forma:

$$E = E^{\circ} - \frac{RT}{nF} \ln(Q) \dots \dots \dots \text{Ec. 2}$$

Donde E es el potencial corregido del electrodo, E° es el potencial en condiciones estándar (0.2224 V para la plata vs potencial de Hidrógeno), R la constante de los gases ($8.314472 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$), T es la temperatura absoluta en Kelvin (298 K), n la cantidad de mol de electrones que participan en la reacción (para este caso tiene un valor de 2), F la constante de Faraday (96485.3365 C/mol) y Q el cociente de reacción correspondiente.

Utilizando el tratamiento matemático de Cranny et al. (2011), se tiene que reescribir esta ecuación adaptándola a concentraciones más que a actividades debido a la naturaleza del mismo electrodo, es decir se obtiene la **Ec. 3**.

$$E = E^{\circ} - \left(\frac{RT}{nF} \right) \ln \left[\frac{[AgCl]}{[AgCl] \cdot [Cl^{-}]} \right] \dots \dots \dots \text{Ec. 3}$$

Teóricamente la concentración de AgCl debería ser constante en medio acuoso en presencia de cualquier concentración de cloruros, por lo tanto se puede

reescribir como k , también se puede realizar una simplificación por temperatura constante y debido a las concentraciones de cloruros se le da un tratamiento a la ecuación para pasar de un logaritmo neperiano a un logaritmo base decimal, es decir se multiplica esta constante por el factor (2.302) para realizar este cambio, por lo que se obtiene una ecuación de la forma:

$$E = E^o - 0.05912 \cdot [\log|Cl^-| - \log(k)] \dots \text{Ec. 4}$$

$$E = E^o - 0.05912 \log|Cl^-| + 0.05912 \log(k) \dots \text{Ec. 5}$$

Reescribiendo la **Ec. 4** se obtiene la **Ec. 5** en la que se puede observar que bajo condiciones teóricas el potencial del electrodo debería disminuir aproximadamente 59 mV cada década de cambio (es decir de 10 mM a 100 mM a 1 M, etc.) en las concentraciones de cloruros.

Aunado a estos análisis se realizaron las pruebas de Difracción de Rayos X (XRD) a los electrodos de AgNP en dos superficies diferentes, debido a la naturaleza cristalina de la plata, es posible realizar estos análisis, la finalidad de estos era comprobar el funcionamiento de la tinta de nanopartículas en la superficie de Toray y de una hoja de PVC el cuál era una opción para utilizar como base para los electrodos. En la **Fig. 32** se aprecia el análisis de XRD realizado, en éste se pueden observar las difracciones de Bragg características de la plata en su forma cúbica, que se encuentran en los planos (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0) y (3 1 1). Se decide utilizar el papel Toray para tener uniformidad en el diseño del sensor.

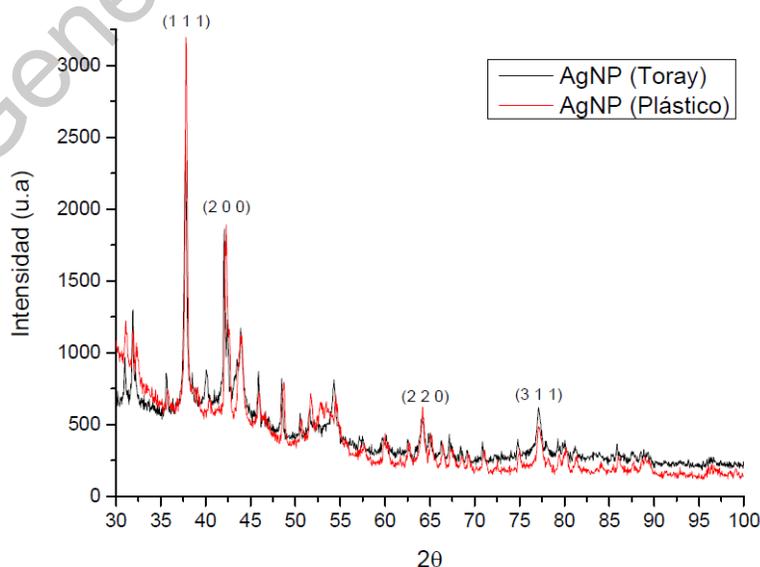


Fig. 32 Difractograma de Rayos X realizado a tinta de nanopartículas de plata en superficie de papel de nanofibras de carbono (negro) y sobre superficie de hoja de PVC (rojo).

Así como en los análisis realizados para el biosensor de glucosa, para este sensor se realizaron pruebas por triplicado, la **Fig. 33** presenta los resultados estadísticos de estos análisis realizados.

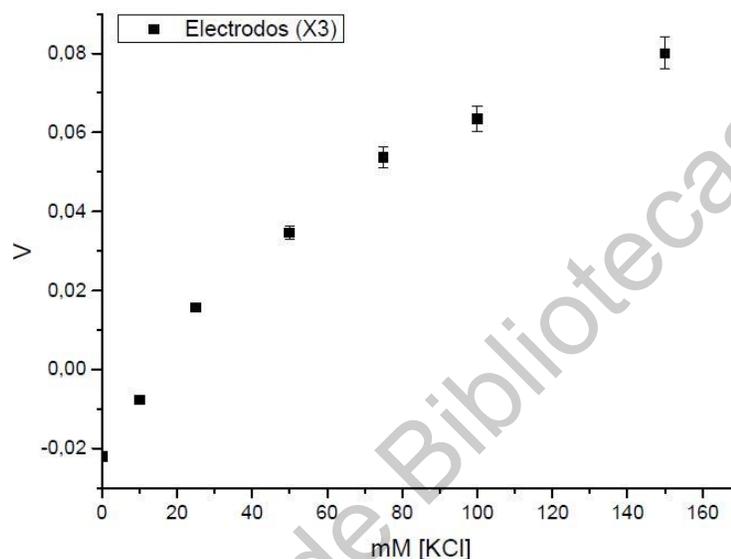


Fig. 33 Concentraciones de KCl vs promedio de voltaje obtenido por OCP de tres electrodos de Ag/AgCl comercial vs Ag/AgCl (agar) en nanofibras de carbono en PBS pH 7.4 sin agitación.

El comportamiento lineal de los resultados obtenidos del análisis de OCP de diferentes electrodos fabricados de la misma forma, resultados mostrados en esta gráfica se puede explicar mediante la ecuación $y = 0.0005x + 0.0089V$ con una $R^2 = 0.9526$.

Cabe recordar que estos resultados se obtuvieron por análisis en estático, por lo que la difusión de KCl en el sistema no se ve forzada o favorecida, la finalidad, como se menciona previamente, es tener las condiciones lo más similares a las esperadas al realizar un análisis en un sensor tipo parche más adelante; estos resultados son favorables, reproducibles y comparables con los obtenidos con otros trabajos.

Aunado a este análisis se realizó de la misma forma el análisis modificando el pH a 5.6 en la solución de prueba con la finalidad de comprobar que el comportamiento del sistema no se modifica con el efecto de la modificación del pH en la solución y aproximar las condiciones a las futuras esperadas, estas pruebas se realizaron igual por triplicado y los resultados estadísticos se muestran en la **Fig. 34**.

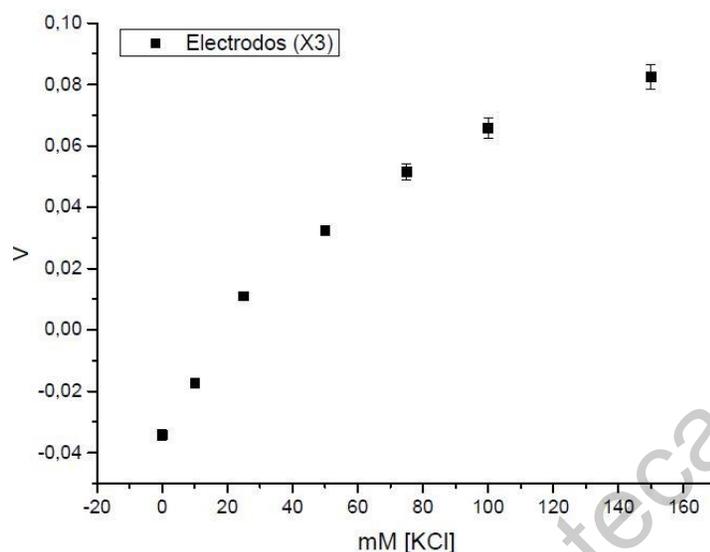


Fig. 34 Concentraciones de KCl vs promedio de voltaje obtenido por OCP de tres electrodos de Ag/AgCl comercial vs Ag/AgCl (agar) en nanofibras de carbono en PBS pH 5.6 sin agitación.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se tiene que para el análisis del electrodo en pH 7.4 se tiene una pérdida de 85.4 mV/década y para el electrodo en pH 5.6 existe una pérdida de 83.1 mV/década, si bien entre estos análisis la diferencia de pérdidas es mínima, sin embargo de acuerdo al análisis de Nernst realizado existe una diferencia de aproximadamente 26.4 y 24.1 mV/década respectivamente, esto quiere decir que el electrodo no se está comportando como teóricamente debería comportarse.

Recordando que la ecuación de Nernst se utiliza como un método predictivo del comportamiento, si se observa a detalle la **Ec. 5** se tomó la concentración de cloruros de plata en el electrodo como una constante, pero si existe un cambio en esta concentración a lo largo del análisis, el comportamiento Nernstiano del electrodo varía con cada concentración.

A partir de este análisis se realizaron los despejes en la ecuación y los cálculos necesarios, se observa que para cada concentración de cloruros en la solución la concentración de cloruros de plata aumenta de forma directa, esto quiere decir que el electrodo se está saturando de cloruros conforme aumenta la concentración de los mismos en la solución, de forma concluyente esto se debe a que el Agar en el electrodo no está cumpliendo su función, es decir, el depósito de Agar no está protegiendo la capa de cloruros de plata en el electrodo y evitar la modificación del mismo.

Debido a esto se pretende realizar un cambio en la forma en que se realiza esta capa para que cumpla su función. En la *Tabla 8* se muestra de forma comparativa los resultados obtenidos por este trabajo contra los resultados obtenidos por los trabajos de otros autores, en esta tabla se aprecia que la caída de voltaje del sensor construido es mucho mayor que la caída en los electrodos de otros trabajos, este resultado no resulta conveniente debido a lo explicado anteriormente.

Tabla 8. Tabla comparativa de electrodo de Ag/AgCl vs otros trabajos.

R	pH	Especie	LQ	LOD	Sensibilidad	Caída
Este	5,6	Ag/AgCl (agar)	178.21 mM	53.46 mM	0.0024 V/mM cm ²	83.1 mV/dec
	7,4	Ag/AgCl (agar)	153.21 mM	51.96 mM	0.002 V/mM cm ²	85.4 mV/dec
[8]		Ag/AgCl (agar PVC)				58.5 mV
[25]	6.5	HIPM en PVC		0.01 μM		59.8 mV/dec
[5]	2	AgNP en carbono		3 μM	292.2 μA/M	292.2 μA/M
[22]		Ag/AgCl (hg KCl)			6.3 mV	65 mV
[17]		Ag/AgCl (hg KCl)			57 mV/decade	
[16]	4.6	Ag		1.5 mM	0.537 μA/μM	

*R=referencia, LQ=límite de cuantificación, LOD=límite de detección

5.3 Dispositivo electrónico

Se realizaron pruebas iniciales al prototipo del dispositivo utilizando el biosensor de glucosa (electrodo de Fc-PLL (GOx) en NFC). Para estas pruebas únicamente se busca que tanto el conversor como las señales generadas sean lo más similares a lo que se está obteniendo en el potencióstato. Se conecta el dispositivo como se describe en la metodología de forma física, asimismo se le indica al microcontrolador desde el programa que almacene las señales generadas cada segundo hasta detener el análisis.

Debido a la naturaleza de los electrodos, así como la conexión de estos al dispositivo, se conectaron mediante caimanes al mismo tiempo al potencióstato para obtener datos de mayor precisión. Al realizar la primera prueba se observó que no se apreciaba ninguna señal almacenada por lo que al revisar la hoja de datos del conversor se observa que el rango de las corrientes del mismo van de 0 mA a 20 mA, por lo que se decide acoplar al dispositivo un amplificador de corriente que convierta señales de 1.0 μA a 2 mA, al realizar este acoplamiento se realiza una modificación en el programa en el que los datos que se muestran pasan por un filtro para ajustar los datos de corriente obtenidos a los datos de corriente amplificados,

este filtro matemático se realiza con una regla de equivalencia de acuerdo a lo analizado.

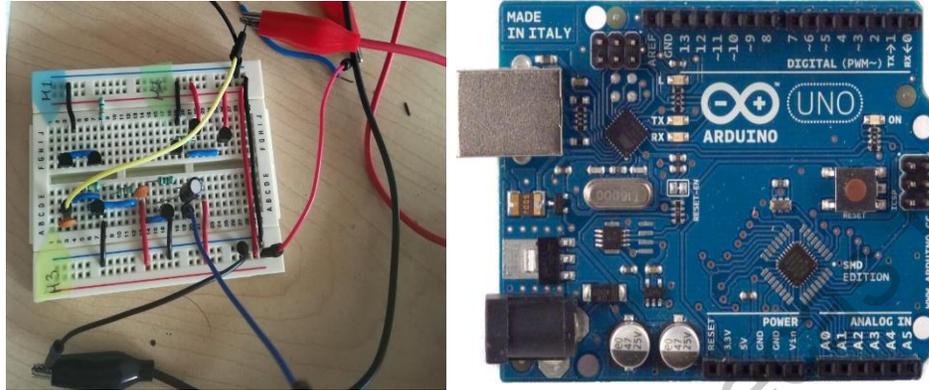


Fig. 35 Componentes de dispositivo electrónico. Izquierda: Amplificador de corriente para dispositivo. Derecha: Microcontrolador Arduino UNO mostrando pines de conexión.

Se realizaron pruebas amperométricas bajo las mismas condiciones que los análisis previamente realizados, en la **Fig. 36** se observan los resultados obtenidos por el dispositivo (rojo) y su comparación con lo obtenido por el potencióstato (negro).

Se puede observar que el dispositivo no registra datos obtenidos menores a $1 \mu\text{A}$, esto debido a la capacidad del amplificador realizado, esto genera una limitante en la capacidad del dispositivo, haciéndolo sensible a concentraciones únicamente mayores a aproximadamente 2 mM de glucosa.

Entre otras observaciones realizadas se distinguen cambios en las corrientes analizadas respecto a lo obtenido por el potencióstato, esto puede deberse a muchos factores, sin embargo, los resultados obtenidos son altamente similares, lo que indica un funcionamiento apropiado del mismo dispositivo.

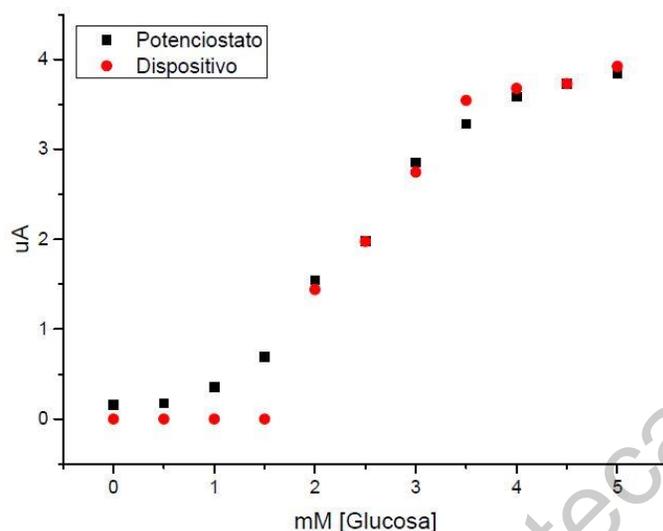


Fig. 36 Concentraciones de glucosa vs promedio de corriente obtenida por cronoamperometría de electrodos de trabajo de Fc-PLL (GOx) en electrodos de NFC vs Ag/AgCl (fabricado) en PBS pH 5.6 a 360mV en estático obtenidos por potenciostato y por dispositivo electrónico.

Entre los resultados obtenidos se encontró que las lecturas obtenidas por el dispositivo tenían mucho ruido (señales interferentes en el análisis), así como variaciones en las corrientes y se considera la limitante de la corriente mínima de lectura del dispositivo (1 μ A) esto disminuye la eficiencia del dispositivo debido a que el biosensor desarrollado por este proyecto tiene sensibilidad a corrientes mucho menores, debido a estas observaciones realizadas se propone realizar cambios en el amplificador del prototipo, ajustar desde el programa la resolución de las señales obtenidas, así como realizar ajustes a la parte física del dispositivo, tales como soldar todos los componentes a una placa fenólica y realizar pruebas posteriores en el sensor de cloruros una vez que éste funcione apropiadamente.

6. CONCLUSIONES

A lo largo de este proyecto se comprobó que el uso de materiales microporosos de carbono (NFC) impregnados con materiales enzimáticos (Fc-PLL (GOx) o inorgánicos (Ag/AgCl) que se acoplan a un circuito electrónico permiten la construcción de un dispositivo biosensor flexible para la detección simple y no intrusiva de metabolitos (glucosa y cloruros) encontrados en el sudor.

Para el biosensor de glucosa hecho a base de electrodos de NFC con depósitos de Fc-PLL (GOx) como especie de detección es altamente viable de utilizarse a futuro con esta finalidad, el polímero (Fc-PLL) demostró tener un excelente comportamiento respecto a lo reportado por otros autores, así mismo favorece el funcionamiento de la enzima glucosa oxidasa como especie de detección de la glucosa en soluciones. Este polímero cuenta con una consistencia como tinta, lo que lo hace ideal para su depósito en superficies porosas, asimismo la síntesis de este polímero comprende de relativamente poco tiempo (48 h) y de bajo costo, que son factores que tener en alta consideración. Otro factor para tomar en cuenta es que este polímero tiene muy buena selectividad, es decir, que no modifica de forma drástica su detección de glucosa en presencia de otras sustancias. Si bien su forma de construcción es rústica, puede apreciarse una tendencia en el funcionamiento del mismo biosensor el cual resulta prometedor.

El sensor de Ag/AgCl en NFC presentó buenos niveles de detección de cloruros en las soluciones, así como una tendencia de reproducción confiable, sin embargo la capa de agar que debía proteger la superficie del electrodo para evitar la saturación del mismo de cloruros, no está cumpliendo con su cometido, por lo que en proyecciones futuras se busca encontrar una capa protectora que sea capaz de cumplir esta función de protección y que también permita la capacidad de detección del sensor de cloruros sin mayor problema. Este sensor, debido a su naturaleza potenciométrica, se vuelve un poco más complicado de construir en dispositivos tipo parche flexible, sin embargo, con mayor experimentación se pretende alcanzar esta meta.

El acoplamiento de circuitos electrónicos a electrodos electroquímicos requiere de la construcción especializada de modificadores, tales como amplificadores de señales y conversores de tipos de señales, estas características son muy difíciles de controlar debido a los rangos de corriente manejados en el análisis (menores a 10 μA), los dispositivos comerciales actuales no cuentan con esta capacidad de análisis, pero al realizar un dispositivo acoplado se puede llegar a un prototipo funcional como el logrado en este proyecto, sin embargo es un prototipo que aún requiere de mucha afinación y de optimización. En este proyecto

sólo se realizó la parte del análisis con el biosensor de glucosa debido al tiempo de trabajo, aun así, se considera altamente viable su uso acoplado a electrodos que detecten diferentes sustancias, así como su futura optimización para el mejoramiento de las señales.

6.1 Perspectivas del proyecto

En general este proyecto da oportunidad a una gran variedad de modificaciones u optimizaciones a realizar para el desarrollo de un dispositivo de gran valor, entre las perspectivas del proyecto se considera aplicar ambos sensores (glucosa y cloruros) al parche en conjunto para su posterior análisis en humanos. También se propone la inmovilización de diferentes enzimas en el polímero (Fc-PLL) para su uso como sensores de diferentes metabolitos de interés, tales como urea, lactato, entre otros.

Específicamente para el sensor de cloruros se espera realizar la capa protectora que funcione apropiadamente en el electrodo, este desarrollo permitirá aplicar este electrodo de referencia construido a diferentes proyectos de análisis, no sólo de cloruros, si no de múltiples sustancias en diferentes áreas del análisis nanofluídico.

Como perspectiva final se propone el desarrollo de un programa y un dispositivo de análisis de señales a microescala para su aplicación a biosensores que generen corrientes o voltajes de esta naturaleza.

7. REFERENCIAS

- [1] Aïzel, K., Fouillet, Y., Pudda, C., & Chabrol, C. (2012). Investigation of Ion Concentration Polarization in original Micro-Nanofluidic devices. *Procedia Engineering*, 269-272.
- [2] Anastasova, S., Crewther, B., Bembnowicz, P., Curto, V., Ip, H. M., Rosa, B., & Yang, G.-Z. (2017). A wearable multisensing patch for continuous sweat monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 139-145.
- [3] Bandonkar, A. (2014). Epidermal tattoo potentiometric sodium sensors with wireless signal transduction for continuous non-invasive sweat monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 603-609.
- [4] Buerk, D. G. (1993). *Biosensors Theory and Applications*. Taylor & Francis Group, CRC Press.
- [5] Bujes-Garrido, J., Izquierdo-Bote, D., Heras, A., Colina, A. & Arcos-Martínez, M. J. (2018). Determination of halides using Ag nanoparticles-modified disposable electrodes. A first approach to a wearable sensor for quantification of chloride ions. *Analytica Chimica Acta*, vol. 1012, 42-48.
- [6] Chen, X., & Zhang, L. (2018). Review in manufacturing methods of nanochannels of bio-nanofluidic chips. *Sensors and Actuators B*, 648-659.
- [7] Choi, D.-H., Kim, J. S., Cutting, G. R., Searson, P. C. (2016). Wearable potentiometric chloride sweat sensor: the critical role of the salt bridge. *Analytical Chemistry*, vol. 88, 12241-12247.
- [8] Choi, D.-H., Li, Y., Cutting, G. R., & Searson, P. C. (2017). A wearable potentiometric sensor with integrated salt bridge for sweat chloride measurement. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 673-678.
- [9] Choi, Y. J. & Luo, T. J. M. (2011). Electrochemical Properties of Silver Nanoparticle Doped Aminosilica Nanocomposite. *International Journal of Electrochemistry*, vol. 2011.
- [10] Cinti, S., Fiore, L., Massoud, R., Cortese, C., Moscone, D., Palleschi, G., & Arduini, F. (2018). Low-cost reagent-free paper-based device to detect chloride ions in serum and sweat. *Talanta*, 186-192.
- [11] Comba, F. N., Rubianes, M. D., Cabrera, L., Gutierrez, S., Herrasti, P. & Rivas, G. A. (2010). Highly Sensitive and Selective Glucose Biosensing at

Carbon Paste Electrodes Modified with Electrogenenerated Magnetite Nanoparticles and Glucose Oxidase. *Electroanalysis*, vol. 22, 1566-1572.

- [12] Conlisk, A. (2013). *Essentials of micro- and nanofluidics: with applications to the biological and chemical sciences*. New York: Cambridge University Press.
- [13] Corrie, S., Coffrey, J., Islam, J., Markey, K., & Kendall, A. (2015). Blood, sweat and tears: developing clinically relevant protein biosensor for integrated body fluid analysis . *Analyst*, 4350-4364.
- [14] Cranny, A., Harris, N., Nie, M., Wharton, J., Wood, R., & Stokes, K. (2011). Screen-printed potentiometric Ag/AgCl Chloride sensors: Lifetime performance and their use in soil salt measurements. *Sensors and Actuators A*, 288-294.
- [15] Curto, V. F., Coyle, S., Byrne, R., Angelov, N., Diamond, D., & Benito-López, F. (2012). Concept and development of an autonomous wearable microfluidic platform for real time pH sweat analysis . *Sensors and Actuators B*, 263-270.
- [16] Daiguji, H. (2011). *Comprehensive nanoscience and technology. Reference module in materials science and material engineering*, 315-338.
- [17] Dam, V. A. T., Zevenbergen, M. A. G. & van Schaijk, R. (2015). Flexible chloride sensor for sweat analysis. *Procedia Engineering*, vol. 120, 237-240.
- [18] Dam, V., Zevenbergen, M., & van Schaijk, R. (2016). Toward wearable patch for sweat analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 834-838.
- [19] Delgado-Provedano, M., Calderón-Santiago, M., Luque de Castro, M., & Priego-Capote, F. (2018). Metabolomics analysis of human sweat collected after moderate exercise. *Talanta*, 47-65.
- [20] Demain, A. L. (1980). Microbial production of primary metabolites. *Naturwissenschaften*, 582-587.
- [21] Escalona-Villalpando, Ricardo A., Reid, Russell C., Milton, Ross D., Arriaga, L. G., Minter, Shelley D. & Ledesma-García, Janet (2017) Improving the performance of lactate/oxygen biofuel cells using a microfluidic design. *Journal of Power Sources*, 546-552.
- [22] Escalona-Villalpando, Ricardo A., Ortiz-Ortega, Euth, Bocanegra-Ugalde J.P., Arriaga, L. G., Minter, Shelley D. & Ledesma-García, Janet (2019)

Clean energy from human sweat using an enzymatic patch. *Journal of Power Sources*, 496-504.

- [23] Faraday, M. (1834). On electrical decomposition. *Philosophical Transactions of the Royal Society*.
- [24] Gonzalo-Ruiz, J. (2009). Early determination of cystic fibrosis by electrochemical chloride quantification in sweat. *Biosensors and Bioelectronics*, 1788-1791.
- [25] Guinovart, T. (2013). A potentiometric tattoo sensor for monitoring ammonium in sweat. *Analys*, 123-128.
- [26] Guinovart, T. (2013). Potentiometric sensors using cotton yarns, carbon nanotubes and polymeric membranes. *Analyst*, 5208-5215.
- [27] Gupta, V. K., Goyal, R., & Sharma, R. A. (2009). Chloride selective potentiometric sensor based on a newly synthesized hydrogen bonding anion receptor. *Electrochimica Acta*, 4216-4222.
- [28] Gutierrez, F., Rubianes, M. D. & Rivas, G. A. (2012). Dispersion of multi-wall carbon nanotubes on glucose oxidase: Characterization and analytical applications for glucose biosensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 161, 191-197.
- [29] Hendricks, A. J., Vaughn, A. R., Clark, A. K., Yosipovitch, G., & Shi, V. Y. (2018). Sweat mechanism and dysfunctions in atopic dermatitis. *Journal of Dermatological Science*, 105-11.
- [30] Jia, W. (2013). Electrochemical tattoo biosensors for real-time non-invasive lactate monitoring in human perspiration. *Chemica Analytica*, 6553-6560.
- [31] Khodagholy, D. (2012). Organic electrochemical transistor incorporating an ionogel as a solid state electrolyte for lactate sensing. *J. Mater Chemica*, 4440-4443.
- [32] Kintz, P., & Samy, N. (2000). Unconventional samples and alternative matrices, in: M.J. Bogusz. *Handbook of Analytical Separations*, 459-488.
- [33] Lee, J.-B., Na, S.-B., & Kim, T.-W. (2016). Improved sweat gland function during active heating in tennis athletes. *Journal of Sport and Health Science* 5, 443-447.

- [34] Lin, L., Chen, Q., & Sun, J. (2018). Micro/nanofluidics-enabled single-cell biochemical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 66-74.
- [35] Mazia, D., Schatten, G. & Sale, W. (1975). Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscope. *Rockefeller University Press*, vol.66, 198-200. DOI <https://doi.org/10.1083/jcb.66.1.198>.
- [36] Mena-Bravo, A., & Luque de Castro, M. (2014). Sweat: A sample with limited present applications and promising future in metabolomics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , 139-147.
- [37] Mitsubayashi, Y. (2003). Wearable and flexible oxygen sensor for transcutaneous oxygen monitoring. *Sensors and Actuators B*, 373-377.
- [38] Munje, R. D., Muthukumar, S. & Prasad, S. (2017). Lancet-free and label-free diagnostics of glucose in sweat using Zinc Oxide based flexible bioelectronics. *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 238m 482-490.
- [39] Nagarale, R. K., Lee, J. M. & Shin, W. (2009). Electrochemical properties of ferrocene modified polysiloxane/chitosan nanocomposite and its application to glucose sensor. *Electrochimica Acta*, vol. 54, 6508-6514.
- [40] Nilsson, S. & Robinson, N. D. (2016). On the anodic deposition of poly-L-lysine on indium tin oxide. *Electrochimica Acta*, vol. 196, 629-633.
- [41] Nochilson, J. W. (2006). *The Chemistry of Polymers*, 3ra. Edición, University of Greenwich.
- [42] Nordin, A. N., Zainuddin, A. A., Rahim, R. A., Voiculescu, I., & Mak, W. C. (2017). Screen printed electromechanical Micro-Total Analysis System for sensitive and rapid detection of infectious diseases. *Procedia Technology*, 100-101.
- [43] Oje, A. I., Ogwu, A. A., Mirzaelan, M. & Tsendzughul, N. (2018). Electrochemical energy storage of silver and silver oxide thin films in an aqueous NaCl electrolyte. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 829, 59-68.
- [44] Onor, M., Gufoni, S., Lomonaco, T., Ghimenti, S., Salvo, P., Sorrentino, F., & Bramanti, E. (2017). Potentiometric sensor for non invasive lactate determination in human sweat. *Analytica Chimica Acta*, 80-87.

- [45] Palomera, N., Vera, J. L., Meléndez, E., Ramirez-Vick, J. E., Tomar, M. S., Arya, S. K. & Singh, S. P. (2011). Redox active poly(pyrrole-N-ferrocene-pyrrole) copolymer based mediator-less biosensors. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 658, 33-37.
- [46] Pourbeyram, S. & Mehdizadeh, K. (2016). Nonenzymatic glucose sensor based on disposable pencil electrode modified by copper nanoparticles. *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 24, 894-902.
- [47] Rubianes, M. D. & Rivas, G. A. (2003). Use of a Melanin-Type Polymer to Improve the Selectivity of Glucose Biosensors. *Analytical Letters*, vol. 36, 1311-1323.
- [48] Schazmann, B. (2010). A wearable electrochemical sensor for the real-time measurement of sweat sodium concentration. *Analytical Methods*, 342-348.
- [49] Shahar, H., Tan, L. L., Ta, G. C. & Heng, L. Y. (2019). Optical enzymatic biosensor membrane for rapid in situ detection of organohalide in water samples. *Microchemical Journal*, vol. 146, 41-48.
- [50] Shahar, H., Tan, L. L., Ta, G. C. & Heng, L. Y. (2019). Detection of halogenated hydrocarbon pollutants using enzymatic reflectance biosensor. *Sensors & Actuators B: Chemical*, vol. 281, 80-89.
- [51] Varmira, K., Mohammadi, G., Mahmoudi, M., Khodarahmi, R., Rashidi, K., Hedayati, M., Goicochea, H. C., Jalalvand, A. R. (2018). Fabrication of a novel enzymatic electrochemical biosensor for determination of tyrosine in some food samples. *Talanta*, vol. 183, 1-10.
- [52] Vukojević, V., Djurdjić, S., Ognjanović, M., Fabián, M., Samphao, A., Kalcher, K. & Stanković, D. M. (2018). Enzymatic biosensor based on manganese dioxide nanoparticles decorated on graphene nanoribbons. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 823, 610-616.
- [53] Wang, Z., Han, T., Jeon, T.-J., Park, S., & Kim, S. (2013). Rapid detection and quantification of bacteria using an integrated micro/nanofluidic device. *Sensors and Actuators B*, 683-688.
- [54] Whitehouse, A. (1935). The Dissolved Constituents of Human Sweat. *Proceedings of the Royal Society of London*, 139-154.
- [55] Windmiller, J. (2012). Stamp transfer electrodes for electrochemical sensing on non-planar and oversized surfaces. *Analyst*, 1570-1575.

- [56] Xu, Z., Li, Y.-K., Wang, J.-Y., Liu, C., Liu, J.-S., Chena, L., & Wang, L.-D. (2014). A novel method for fabrication of Micro-Nanofluidic devices and its application in trace enrichment . *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 166-172.
- [57] Yang, W., Fan, J., Yu, Y., Yin, G. & Li, H. (2014). Effect of film-forming solution pH on the properties of chitosan-ferrocene film electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 767, 160-166.
- [58] Yang, Y. (2010). Thick-film textile-based amperometric sensors and biosensors. *Analyst*, 1230-1234.
- [59] Yoon, H., Xuan, X., Jeong, S. & Park, J. Y. (2018). Wearable, robust, non-enzymatic continuous glucose monitoring system and its in vivo investigation. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 117, 267-275.
- [60] Zhang, H., Wang, Y., Gao, X., Gao, Z. & Chen, Y. (2017). High reproducibility and sensitivity of bifacial copper nanowire array for detection of glucose. *Progress in Natural Science: Materials International*, vol. 27, 311-315.
- [61] Zhang, W., Du, Y., Wang, M. L. (2015). Noninvasive glucose monitoring using saliva nano-biosensor. *Sensing and Bio-sensing research*, 23-29.
- [62] Zhuo, Y., Han, J., Tang, L., Liao, N., Gui, G. F., Chai, Y. Q. & Yuan, R. (2014). Quenching of the emission of peroxydisulfate system by ferrocene functionalized chitosan nanoparticles: A sensitive "signal off" electrochemiluminescence immunosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 192, 791-795.