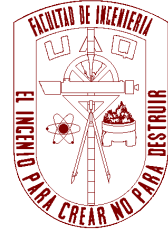




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE INGENIERÍA
INGENIERÍA EN NANOTECNOLOGÍA



Desarrollo de un sensor inalámbrico flexible para la cuantificación de glucosa en sudor

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Ingeniero en Nanotecnología

Presenta:

Ariadna Yaneli Reséndiz Jaramillo

Dirigido por:

Dr. Ricardo Antonio Escalona Villalpando

Codirigido:

Dra. Janet Ledesma García

Centro universitario, Querétaro, Qro.

Noviembre 2021

Desarrollo de un sensor inalámbrico flexible para la cuantificación de glucosa en sudor

Presentada por:

Ariadna Yaneli Reséndiz Jaramillo

Dirigida por:

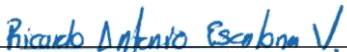
Ricardo Antonio Escalona Villalpando

Codirigida por:

Dra. Janet Ledesma García

Dr. Ricardo Antonio Escalona Villalpando

Director



Firma

Dra. Janet Ledesma García

Codirectora



Firma

Dr. José Luis González Córdoba

Sinodal



Firma

Dr. Goldie Harikrishna Oza

Sinodal



Firma

RESUMEN

En este proyecto, se desarrolló un biosensor flexible de glucosa tipo parche con comunicación inalámbrica que consiste en un sistema de 3 electrodos usando como contra electrodo papel toray, electrodo de referencia de nanopartículas de plata con cloruros y electrodo de trabajo nanotubos de carbono (MWCNT), glucosa oxidasa (GOx) y Ferroceno metanol (FcMeOH). La mayor parte de los experimentos se caracterizaron por técnicas electroquímicas. La elección del método de inmovilización se llevó a cabo variando los reactivos y parámetros, como el uso del tipo de nanotubos de carbono (NTC), generación del sensor monitoreando el peróxido generado en la reacción enzimática o a través de un mediador electroquímico.

La optimización del método de inmovilización fue realizada variando las concentraciones y relación entre la enzima FcMeOH y MWCNT. Se evaluaron los electrodos por técnicas electroquímicas en estático y en agitación para analizar la respuesta de la enzima y comparar los valores de corriente obtenidos con cada una de las concentraciones. En la optimización se obtuvo como resultado concentración de 15 mg ml^{-1} de GOx, 2 mg ml^{-1} de FcMeOH y 5 mg ml^{-1} de MWCNT. También se realizaron pruebas de interferentes con las sustancias más abundantes encontradas en el sudor y sangre que pudieran causar alguna interferencia con la medición del biosensor.

En la optimización de los bioelectrodos, se obtuvo un biosensor de tipo amperométrico el cual mide corrientes entre 1.57 a $27.17 \mu\text{A}$. En los análisis realizados a pH 5.6 el registra un límite de cuantificación de 1.4 mM , límite de detección de 0.42 mM , un sensibilidad igual a $0.0049 \mu\text{A mM}^{-1} \text{ cm}^2$, tiene una constante de Michaelis-Menten de 4.08 mM y alcanza una corriente máxima de $833.33 \mu\text{A cm}^{-2}$, en análisis de rango lineal de 0 a 6 mM de glucosa obtiene una corriente de $450 \mu\text{A cm}^{-2}$. Tiene un excelente comportamiento en presencia de interferentes como dopamina (0.05 mM), ácido úrico (0.2 mM) y ácido ascórbico (0.001 mM) concentraciones presentadas en sudor y ácido úrico (0.3 mM), ácido ascórbico (0.06 mM), dopamina (12 nM) los cuales son concentraciones presentes en sangre.

El dispositivo electrónico diseñado para las características específicas de este biosensor cuenta con un módulo Esp32, una configuración para medir circuito abierto, un potenciómetro y un convertidor de corriente a voltaje y se conecta mediante bluetooth a una aplicación de un teléfono inteligente la cual fue diseñada en app inventor.

A los electrodos se colocados sobre un parche de adhesivo biocompatible (Tegaderm ®), se les agrega sudor y se conectan al dispositivo electrónico para realizar las pruebas electroquímicas. El módulo Esp32 está programado para procesar los datos y obtener el valor de glucosa en sangre en unidades de mg/dl, este valor es enviado mediante bluetooth a una aplicación instalada en un teléfono inteligente la cual muestra en pantalla el valor de glucosa.

Palabras clave: biosensor, comunicación bluetooth, dispositivo electrónico, glucosa oxidasa, parche, sudor.

SUMMARY

In this project, a flexible patch-type glucose biosensor with wireless communication was developed consisting of a 3-electrode system using as counter electrode toray paper, reference electrode of silver nanoparticles with chlorides and working electrode carbon nanotubes (MWCNT), glucose oxidase (GOx) and Ferrocene methanol (FcMeOH). Most of the experiments used electrochemical techniques. The choice of the immobilization method was carried out by varying the reagents and parameters, such as the use of the type of carbon nanotubes (CNT), way of following the reaction; monitoring the peroxide generated in the enzymatic reaction or through an electrochemical mediator.

Optimization of the immobilization method was performed by varying the concentrations of FcMeOH and MWCNT enzyme. Static and shaking electrochemical tests were performed to analyze the enzyme response and compare the current values obtained with each of the concentrations, in the end it was decided to use a concentration of 15 mg/ml of GOx, 2 mg/ml of FcMeOH and 5 mg/ml of MWCNT. Interferent tests were also performed with the most abundant substances found in sweat and blood that could cause some interference with the biosensor measurement.

It is an amperometric type biosensor which measures currents between 1.57 to 27.17 μA . In the analysis performed at pH 5.6 it registers a quantification limit of 1.4 mM, detection limit of 0.42 mM, sensitivity equal to 0.0049 $\mu\text{A}/\text{mM cm}^2$, has a Michaelis-Menten constant of 4.08 mM and reaches a maximum current of 833.33 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, in linear range analysis from 0 to 6 mM glucose it obtains a current of 450 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$. It has an excellent behavior in the presence of interferents such as dopamine (0.05 mM), uric acid (0.2 mM) and ascorbic acid (0.001 mM) concentrations present in sweat and uric acid (0.3 mM), ascorbic acid (0.06 mM), dopamine (12 nM) which are concentrations present in blood.

The electronic device designed for the specific characteristics of this biosensor has an Esp32 module, a configuration to measure open circuit, a potentiostat and a current to voltage converter and connects via Bluetooth to a smartphone application which was designed in app inventor.

Electrodes are placed on a biocompatible adhesive patch (Tegaderm ®), sweat is added to them and they are connected to the electronic device to perform the electrochemical tests. The Esp32 module is programmed to process the data and obtain the blood glucose value in units of mg/dl, this value is sent via Bluetooth to an application installed on a smartphone which displays the glucose value on the screen.

Keywords: biosensor, bluetooth communication, electronic device, glucose oxidase, patch, sweat.

Llegar a la meta no es vencer,
lo importante es el camino y en el
caer, levantarse, insistir y aprender....

A mis padres: Luz Ma y Olaf

Mis hermanos: Cynthia y Daniel

Mis mejores amigos: Iván y Alondra

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia, quiero agradecer al Dr. Ricardo Escalona por permitirme trabajar y aprender de él, por guiarme y aconsejarme en mis inicios en la investigación y por respetar en todo momento mis creencias, tiempo y personalidad. A mis hermanitos y compañeros de laboratorio Arruan, Bryan y Erick por los momentos, conocimientos compartidos y por ceder a mi obsesión con el orden en el laboratorio. A la Dra. Janet Ledesma por su apoyo en este proyecto.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, a los profesores y personal que contribuyeron en mi formación como ingeniero, especialmente a los Maestros Xochil y Jesús Santana, los Doctores Eugenio Salgado, Jorge Mendiola, José Luis Gonzales y Carlos Torres quienes me enseñaron con un gran sentido humano y les tengo mucho respeto y cariño.

A mis Padres Olaf y Luz Ma por creer en mí, apoyarme siempre y en todo momento, por enseñarme a seguir mis sueños sin descuidar mi esencia y el sentido de la vida, a mis hermanos Daniel y Cynthia por ser los mejores compañeros de vida, a mi tía Sonia y a su familia por estar al pendiente de mí y ayudarme cuando se me cerraba el mundo, a mis tías Esther y Mari por ser un gran soporte emocional, a mi primo Edgar por ser mi ejemplo a seguir en la ciencia.

A mi mejor amiga Alondra y su familia por acogerme los primeros años de mi carrera, a mi mejor amigo Iván por todas las experiencias, consejos, risas, viajes, tradiciones, cumpleaños y peleas compartidas, a su mamá Araceli, por ser como una segunda madre para mí, por preocuparse por mi salud, mi alimentación, por darme consejos y prestarme su hombro para llorar cada que lo necesité. A mi Amigo Alexis por alegrar siempre mis días con sus ocurrencias y compartir conmigo parte de su vida y su familia.

Al Instituto Jassá por formarme con un sentido humano, especialmente a los maestros Adriana Pedroza, David Araiza y Gerardo Espínola por enseñarme a ser una mujer fuerte, disfrutar mi profesión y a defender mis ideales, al equipo de pastoral Raúl, Jos, Milly, Alexius y Emiliano por compartir vida conmigo y enseñarme un Dios vivo. A mis pequeños

catequitos por recordarme la esencia e inocencia de la infancia y alegrar mis sábados con sus ocurrencias.

Finalmente agradezco a la Universidad Autónoma de Zacatecas especialmente al Dr. Sergio Durón por darme la oportunidad de hacer una estancia de investigación, al Dr. Roberto Espinosa y al maestro Daniel Lozano por compartir sus conocimientos conmigo, facilitarme los materiales y reactivos del laboratorio. A Arturo y Jerry por que sin el sudor de su frente no hubiera sido posible la última etapa de este trabajo. A Moni Macías por alojarme y hacer esta experiencia más divertida.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Biosensores	3
2.2 Partes de un biosensor	3
2.3 Características de un biosensor	3
2.4 Clasificación de los biosensores	4
2.5 Biosensores electroquímicos enzimáticos	4
2.6 Glucosa oxidasa	5
2.7 Métodos de inmovilización de la enzima Glucosa Oxidasa	7
2.7.1 Inmovilización por entrecruzamiento	7
2.8 Análisis del sudor y su vínculo con enfermedades	8
2.9 Glucosa	9
2.10 Glucosa en sudor	10
3. Hipótesis	10
4. Objetivos	10
4.1 Objetivo general	11
4.1 Objetivos Particulares	11
5. Metodología	11
5.1 Preparación del electrodo del papel toray	11
5.2 Preparación del Glutaraldehído	12
5.3 Preparación de los electrodos derivados de GOx	12
5.3.1 Atrapamiento cross linking de GOx/MWCNT	12
5.3.2 Atrapamiento con Fe ₂ O ₃ cross linking de GOx/MWCNT/Fe ₂ O ₃	12
5.3.3 Atrapamiento cross linking con una biotinta de GOx	12
5.3.4 Atrapamiento cross linking con una biotinta de GOx/PEI/MWCNT	13
5.3.5 Atrapamiento cross linking con Fe-PLL/GOx/EDGE	13
5.3.6 Atrapamiento cross linking de GOx/MWCNT/GA/FcMeOH	13
5.4 Colocación de la solución en el electrodo	13
5.5 Caracterización y mediciones electroquímicas	14
5.5.1 Sistema para evaluación de métodos electroquímicos	14

5.5.2 Voltamperometría cíclica (VC)	14
5.5.3 Cronoamperometría	15
5.6 Preparación del electrodo de referencia y contraelectrodo para parche flexible	15
5.7 Diseño electrónico del sensor	16
5.9 Diseño de aplicación para comunicación BT	17
6. Resultados y discusión	18
6.1 Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa usando nanopartículas de carbón y mediadores electroquímicos.	18
6.1.1 Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa con MWCNT en diferentes proporciones	18
6.1.2 Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa con MWCNT y Fe ₂ O ₃	21
6.1.3 Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa con biotina de GOx	23
6.1.3 Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa con Fc-PLL y EDGE	24
6.1.3 Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa con MWCNT/ FeMeOH /GA	26
6.2 Caracterización del método de inmovilización de GOx con MWCNT, GA y FcMeOH	29
	30
6.3 Optimización del método de inmovilización de GOx con MWCNT, GA y FcMeOH	32
6.3 Pruebas de interferentes	35
6.5 Diseño y evaluación del sensor tipo parche	37
6.6 Pruebas con el dispositivo electrónico tipo parche	41
Conclusiones	45
Perspectivas del proyecto	45

Índice de figuras

Figura 1 Reacción de la glucosa oxidasa

Figura 2 Inmovilización de GOx por entrecruzamiento

Figura 3 Sistema de electrodos colocados en el Potenciostato

Figura 4 Diseño electrónico del biosensor

Figura 5 Diseño de bloques para la aplicación primera interfaz interactiva

Figura 6 Segunda interfaz interactiva con el usuario

Figura 7 a) Amperometría a electrodo de MWCNT-(GOx) en relación 1:1 vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 700 mV con adiciones de 1 mM de glucosa b) Concentración de glucosa vs corriente obtenida por amperometría a electrodo de MWCNT-(GOx) en relación 1:1 vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 700 μ A con adiciones de 1 mM de glucosa

Figura 8 a) Amperometría a electrodo de MWCNT-(GOx) en relación 2:1 vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 700 mV con adiciones de 1 mM de glucosa. b) Concentración de glucosa vs corriente obtenida por amperometría a electrodo de MWCNT-(GOx) en relación 2:1 vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 700 μ A con adiciones de 1 mM de glucosa

Figura 9 Amperometría a electrodo de MWCNT-(GOx) en relación 10:1 vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 700 mV con adiciones de 1 mM de glucosa.

Figura 10 a) Amperometría a electrodo de MWCNT-GOx-Fe₂O₃ vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 700 mV con adiciones de 1 mM de glucosa. b) Concentración de glucosa vs corriente obtenida por amperometría a electrodo de MWCNT-GOx-Fe₂O₃ vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 700 μ A con adiciones de 1 mM de glucosa.

Figura 11 Voltamperometría cíclica a electrodo de biotinta de GOx vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 5 mVs⁻¹ sin agitación

Figura 12 Amperometría a electrodo de biotinta de GOx vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 700 mV con adiciones de 1 mM de glucosa b) Concentración de glucosa vs corriente obtenida por amperometría a electrodo de biotinta de GOx vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 700 μ A con adiciones de 1 mM de glucosa.

Figura 13 Voltamperometría cíclica a electrodo de Fe-PLL/GOx/EDGE vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 5 mVs⁻¹ sin agitación.

Figura 14 Amperometría a electrodo de PLL/GOx/EDGE vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 360 mV con adiciones de 1 mM de glucosa. b) Concentración de glucosa vs corriente obtenida por amperometría a electrodo de PLL/GOx/EDGE vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 700 μ A con adiciones de 1 mM de glucosa.

Figura 15 Voltamperometría cíclica a electrodo de GOx/MWCNT/ FeMeOH / GA vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 5 mVs⁻¹ sin agitación

Figura 16 Amperometría a electrodo de GOx/MWCNT/ FcMeOH /GA vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 360 mV con adiciones de 1 mM de glucosa. b) Concentración de glucosa vs corriente obtenida por

amperometría a electrodo de GOx/MWCNT/ FcMeOH /GA vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 700 μ A con adiciones de 1 mM de glucosa.

Figura 17 Amperometría a electrodos vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4. a) comparación de corrientes de electrodos con GOx-MWCNT a diferentes proporciones. comparación de corrientes de electrodos de biotinta de GOx. c) comparación de corrientes de electrodos de MWCT-FcMeOH-GOx

Figura 18 Amperometría a electrodo de GOx/MWCNT/ FcMeOH /GA vs Ag/AgCl en PBS pH 5.6 a 360 μ A con adiciones de 1 mM de glucosa.

Figura 19 Comparativo de respuesta de electrodo de GOx/MWCNT/ FcMeOH /GA vs Ag/AgCl en PBS pH 5.6 (negro) y 7.4 (rojo)

Figura 20 a) Amperometría a electrodo de MWCNT-FcMeOH (GOx) vs Ag/AgCl en PBS pH 5.6 a 360 mV. Adiciones de Glucosa con concentraciones para sangre (5 mM), AU (0.3 mM), AA (0.06 mM), DA (12 nM) y Glucosa (5mM) b) Gráfica de porcentaje de interferentes

Figura 21 Amperometría a electrodo de MWCNT-FcMeOH (GOx) vs Ag/AgCl en PBS pH 5.6 a 360 mV. Adiciones de Glucosa con concentraciones para sangre (5 mM), AU (0.2 mM), AA (0.01 mM), DA (0.05 mM) y Glucosa (5mM). b) Gráfica de porcentaje de interferentes.

Figura 22 Electrodo de referencia de Ag/AgCl para biosensor de glucosa tipo parche

Figura 23 Biosensor de glucosa tipo parche. a) Biosensor con electrodo de referencia Ag/AgCl con cubierta de resina epóxica. b) Biosensor con electrodo de referencia Ag/AgCl con diseño de puente salino.

Figura 24 Amperometrías estáticas al biosensor de glucosa con adiciones de 1 mM de glucosa. a) Sin puente salino, b) con puente salino.

Figura 25 Diseño de parche para biosensor de glucosa

Figura 26 Amperometría estática a electrodo de GOx/MWCNT/ FcMeOH /GA vs Ag/AgCl en PBS pH 5.6 a 360 μ A con adiciones de 1 mM de glucosa.

Figura 27 Diseño de parche para un biosensor de glucosa usando como base Tegaderm

Figura 28 Amperometría estática a electrodo de GOx/MWCNT/ FcMeOH /GA vs Ag/AgCl en PBS pH 5.6 a 360 μ A con adiciones de 1 mM de glucosa.

Figura 29 Cronoamperometría y voltamperometría cíclica de sudor con biosensor en parche prueba 1

Figura 30 Cronoamperometría y voltamperometría cíclica de sudor con biosensor en parche prueba 2

Figura 31 Amperometría estática en parche con PBS pH 5.6 a 360 μ A con adiciones de 0.5 mM de glucosa.

Figura 32 Interfaz para aplicación en teléfono inteligente

1. Introducción

Actualmente, una de las enfermedades más comunes a nivel mundial es la diabetes, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), tan solo en México 8.7 millones de personas padecen esta enfermedad. Dichos datos posicionan al país en el noveno puesto en casos de diabetes a nivel mundial, según Adolfo Andrade Cetto académico de la Facultad de Ciencias (FC) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). (CEVECE, 2013)

La diabetes es una enfermedad crónica e irreversible del metabolismo en la cual se produce un exceso de glucosa o azúcar en la sangre y orina; es debida a una disminución de la secreción de la hormona insulina o a una deficiencia de su acción. Debido al alto nivel de azúcar en la sangre que tienen las personas con dicha enfermedad, pueden padecer diversas complicaciones como: problemas visuales, úlceras, ataques cardiacos debido a que es complicado controlar la presión arterial, daño en los riñones, entre otras.

Por lo anterior es importante monitorear los niveles de azúcar en la sangre, la presión arterial y el colesterol, para esto se han desarrollado diversos sensores que favorecen su monitoreo. Uno de los aparatos usados actualmente para monitorear el nivel de azúcar en la sangre es un glucómetro, su uso consiste en colocar una gota de sangre sobre una tira reactiva, la cual, está dentro del glucómetro, después de unos instantes se obtiene el nivel de azúcar que existe en la sangre en ese momento.

Es un método práctico pues se puede realizar desde casa y en tiempo real, lo que permite al paciente llevar un registro, sin embargo, es desagradable tener que pincharse el dedo con una lanceta continuamente para obtener la gota de sangre, es por esto que en este trabajo se busca medir el nivel de glucosa existente en el sudor humano, de esta forma se puede desarrollar un sensor dérmico flexible y no invasivo capaz de cuantificar el nivel de glucosa al instante.

Es sabido que los fluidos corporales tales como la orina, las lágrimas y el sudor están compuestos por diversas sustancias entre ellas glucosa. El sudor es un fluido biológico utilizado como mecanismo natural del organismo para regular la temperatura corporal, el cual es transpirado por medio de los poros de la piel, está compuesto por un 99% de agua y otros componentes como NaCl, K, Ca, Mg, Fe, urea, vitaminas (B, C y derivados de k),

ácidos grasos, aminoácidos, ácido láctico, glucosa y colesterol. (De La Torre Fraga & Mesa Álvarez, 2016)

El reto existente en el desarrollo de este biosensor esta dado porque las concentraciones de glucosa en el sudor son realmente bajas, por lo que los límites de detección deberán ser igualmente bajos para lograr detectar los niveles de glucosa.

En el presente trabajo se analizaron 8 métodos distintos para el atrapamiento por crooslinking de la enzima glucosa oxidasa, una vez obtenido el método ideal se realizaron estandarizaciones para determinar la mejor proporción de compuestos buscando siempre obtener corrientes mayores a 1 μA , posteriormente se realizaron pruebas de mínimas adiciones para estudiar la respuesta del biosensor.

Por otro lado, se propusieron 4 diseños de parche en los que varía el diseño del electrodo de referencia Ag/AgCl y el material propuesto como soporte para parche, una vez obtenido el material ideal se realizaron pruebas electroquímicas para caracterizar el biosensor.

Finalmente se construyó la electrónica del biosensor, la cual consiste en una placa operada por un módulo ESP32 la cual está programada para realizar pruebas electroquímicas tales como voltamperometría cíclica, cronoamperometría, cronocoulumbimetria , además de medir el circuito abierto. El modelo electrónico se conecta mediante BT a una aplicación desarrollada para instalarse en dispositivos inteligentes, en ella se presenta una interfaz amigable con el usuario, el cual puede interactuar con ella y recibir información sobre los niveles de glucosa que está midiendo el biosensor.

2. Antecedentes

2.1 Biosensores

Un biosensor es un dispositivo con la capacidad de proveer información cuantitativa específica o semi-cuantitativa por medio de un reconocimiento biológico de elementos, los cuales pueden ser: tejidos, microorganismos, enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, entre otros (Blanco-López, Lobo-Castañón, & Fernández Abedul, 2020). Un analito que se encuentra en un medio externo debe poder entrar al biosensor, para esto, es necesario que la membrana externa del biosensor sea permeable al analito, pero también sea selectiva, es decir, excluya otras especies químicas a las que el biosensor pudiera ser sensible. Para que el biosensor funcione un elemento biológico deberá interactuar con el analito para y dar una respuesta la cual pueda ser detectada por un transductor.

2.2 Partes de un biosensor

Un biosensor convencional está compuesto por: un analito el cual es la sustancia de interés que se necesita detectar, por ejemplo, glucosa para la diabetes; Un biorreceptor compuesto por una molécula que reconoce el analito por ejemplo, las enzimas; Un transductor que generalmente convierte un reconocimiento biológico en una señal medible, conocida como señalización; por otro lado también posee una parte electrónica la cual generalmente procesa la señal transducida mediante una combinación de hardware y software para poder transmitirse en una pantalla la cual comúnmente es de cristal líquido (Jiménez & León, 2009).

2.3 Características de un biosensor

Dentro de las características que cumple un biosensor se encuentran: la selectividad la cual es una de las características más importante del biosensor pues depende del potencial del biorreceptor para detectar el analito específico en una mezcla de muestra y contaminantes; la reproducibilidad del biosensor para programar una salida idéntica después de la repetición

de la configuración experimental; la estabilidad que es la capacidad del biosensor para no ser susceptible en condiciones ambientales dentro y alrededor del sistema de biodetección. Cualquier perturbación puede modular las señales de salida del biosensor para su medición, lo que puede provocar errores y afectar la eficiencia del biosensor y la linealidad: se atribuye a la precisión de la respuesta medida (Hernández et al., 2011).

Comúnmente se utilizan biosensores enzimáticos debido a su alta selectividad, es decir, la capacidad de reconocer un tipo de compuesto en particular, además de presentar ventajas como: mínima preparación de la muestra, alta sensibilidad y selectividad, tiempos cortos de respuesta, conversión directa de la señal electroquímica a señales eléctricas, rapidez, viabilidad en costo, miniaturización y portabilidad (Jiménez & León, 2009).

2.4 Clasificación de los biosensores

Se clasifican en base a la heterogeneidad de materiales, las variables de sus componentes estructurales, los mecanismos químicos, físicos o fisiológicos de su funcionalidad y a los mecanismos de detección de la señal. Los biosensores se pueden clasificar según los siguientes valores (Mendoza Madrigal, 2013).

- ❖ Tipo de interacción: Biocatalíticos o de bioafinidad
- ❖ Método de detección: Directo o indirecto elemento de reconocimiento: Célula, organela, tejido, enzima, receptor, anticuerpo, ácido nucleico, polímero de impresión molecular.
- ❖ Sistema de transducción: nanomecánico, piezoeléctrico, electroquímico, termoeléctrico u óptico.

2.5 Biosensores electroquímicos enzimáticos

Los biosensores electroquímicos enzimáticos utilizan enzimas las cuales catalizan la transformación de un analito por medio de un proceso de transferencia de electrones. La mayoría de los biosensores actuales consisten en depositar una o más enzimas sobre un electrodo, cuya reacción se detecta electroquímicamente mediante la transferencia de electrones que ocurre (Bollella, Gorton, & Antiochia, 2018).

Este biosensor combina la alta especificidad de las enzimas con la respuesta rápida de la reacción producida por el transductor (Wang, 1999). Aunado a esto, gran cantidad de las enzimas de interés para el diseño de biosensores se encuentran aisladas y disponibles de manera comercial. De no ser así, se utilizan células o tejidos que contengan la enzima deseada, sin embargo, se suele tener menos sensibilidad y selectividad al igual que una respuesta más lenta.

Existen diversos grupos de enzimas (Carrazón & García, 2000), dentro de los más importantes están las oxidasas, las cuales catalizan reacciones generales de oxidación; las peroxidasas, las cuales catalizan la oxidación de diferentes compuestos utilizando peróxido de hidrógeno como agente oxidante y por último las deshidrogenasas, las cuales utilizan un cofactor soluble (el componente no proteico de la enzima) como el NADH para realizar la catálisis (Prodromidis & Karayannis, 2002).

Las ventajas de utilizar enzimas las cuales engloban la alta selectividad, respuesta rápida y gran variedad disponible comercialmente y las ventajas provenientes de las técnicas electroquímicas para la construcción de biosensores las cuales son simplicidad, facilidad de miniaturización, sensibilidad para los analitos de interés y bajo coste de la instrumentación hace que a los biosensores enzimáticos electroquímicos los más utilizados y por ende los más usados e investigados sobre todo en el ámbito clínico, agroalimentario y medioambiental (Tothill, 2001)

2.6 Glucosa oxidasa

De las enzimas disponibles comercialmente, las oxidasas son las más utilizadas pues tienen la ventaja de ser estables y en determinadas situaciones no requieren reactivos adicionales. Las oxidasas utilizan oxígeno molecular para la oxidación del sustrato dando peróxido de hidrógeno como subproducto, dicha reacción de oxidación se puede aprovechar de distintas formas (Mello & Kubota, 2002) :

1. Midiendo directamente el oxígeno consumido en la reacción, usando el sensor de oxígeno de Clark, observando la disminución de la corriente que se produce debida

al oxígeno que se consume. Sin embargo, puede haber variaciones de la corriente medida a

cambios en la concentración de oxígeno disuelto, los cuales no necesariamente dependen de la concentración de sustrato. Aunado a esto, la reducción electroquímica del oxígeno con un electrodo de Clark necesita potenciales muy negativos, por lo que se producen corrientes de fondo altas.

2. Midiendo el peróxido de hidrogeno generado por una oxidación la cual se monitorea amperométricamente. Para esto se impone al electrodo de trabajo potencial suficientemente positivo para oxidar el peróxido de hidrógeno generado como consecuencia de la transformación enzimática del analito. De igual manera, se presentan inconvenientes debido a que el potencial que se aplica debe ser lo suficientemente alto para que pueda dar lugar a la oxidación de otro tipo de especies presentes, lo que compromete en gran medida la especificidad del sensor (Dutta, Maji, Biswas, & Adhikary, 2013).

La glucosa oxidasa (GOx) ha sido purificada a partir de diferentes tipos de hongos; los más comunes son los del género *Aspergillus* y *Penicillium*, en ellos la especie *Aspergillus niger* es la más utilizada para la producción de dicha enzima (Leskovac et al., 2005). La glucosa oxidasa está compuesta por dos subunidades de peso molecular aproximado a 80000 Dalton cada una, donde cada subunidad contiene una molécula de coenzima llamada FAD (Flavin Adenin Dinucleótido), la cual conforma la parte electroactiva de la enzima. La FAD cataliza la oxidación de la β -D-glucosa ácido glucónico dando como subproducto peróxido de hidrógeno. El mecanismo de reacción de la glucosa oxidasa cataliza la oxidación de β -D - glucosa en D-gulcono- δ -lactona, la cual se hidroliza generando ácido glucónico. A su vez, la FAD se reduce a FADH₂, posteriormente, la GOx reducida se reoxida utilizando oxígeno por lo que da como subproducto peróxido de hidrógeno (Bankar et al., 2009).

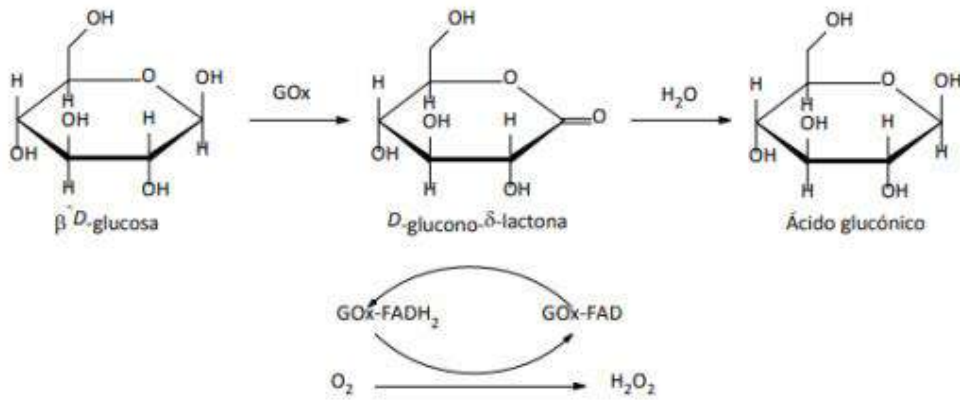


Figura 1 Reacción de la glucosa oxidasa (Bankar et al., 2009)

Otras de las aplicaciones de la glucosa oxidasa es la mejora del color, sabor y vida útil de productos alimenticios, eliminación de oxígeno en zumos de frutas o bebidas envasadas y la prevención de ranciedad en mayonesas. Por otro lado, se ha utilizado junto con la catalasa en kits automáticos de medida de glucosa, actualmente se ha utilizado en biosensores para la estimación de la concentración de glucosa en diluciones industriales o fluidos corporales como sangre, sudor u orina (Bankar et al., 2009).

2.7 Métodos de inmovilización de la enzima Glucosa Oxidasa

La inmovilización enzimática se refiere al confinamiento físico de una enzima localizada en un espacio o región definida, conservando su actividad catalítica. En los biosensores es de suma importancia la inmovilización enzimática pues las enzimas son las que hacen el reconocimiento del sustrato e interaccionan con el medio produciendo la reacción electroquímica. Basándose en la forma, material, tipo de interacción y naturaleza de los reactivos, los métodos de inmovilización se pueden clasificar en tres grupos; unión soporte, atrapamiento o encapsulación y entrecruzamiento o cross-linking (en inglés) (Díaz-González, Escalona-Villalpando, Arriaga, Minter, & Casanova-Moreno, 2020). En el presente trabajo se usará el método cross-linking.

2.7.1 Inmovilización por entrecruzamiento

Se basa en la retención de la enzima, en este método los grupos amino reaccionan con un reactivo bifuncional, por ejemplo, el glutaraldehído (GA), el cual es de los más utilizados pues no es costoso y tiene una gran disponibilidad comercial. Cuando interactúa la enzima con GA esta se mantiene dentro de una matriz con uniones intermoleculares entre las moléculas de la enzima, protegiéndola de la solubilidad y conservando su actividad catalítica.



Figura 2 Inmovilización de GOx por entrecruzamiento (Ricardo A Escalona-Villalpando et al., 2019)

El glutaraldehído es el agente entrecruzador comúnmente utilizado para la inmovilización estable de GOx por medio de la reacción como base de Schiff entre los grupos aldehído del GA los sitios amino libres de la proteína. Como facilitadores para llenar sitios no ocupados por GOx, se emplean otras proteínas inocuas a la reacción, como la hemoglobina y la albúmina (Christwardana, 2017).

2.8 Análisis del sudor y su vínculo con enfermedades

El sudor es un fluido corporal natural producido durante el ejercicio físico y estrés emocional, es ligeramente ácido (pH de 4.0 a 6.8), está compuesto en su mayoría por agua (99%) iones como sodio, cloro y potasio, contiene mínimas concentraciones de urea, lactato, glucosa y piruvato, proteínas, péptidos, aminos, aminoácidos, etc (R.A. Escalona-Villalpando et al., 2017).

Se han aislado las sustancias que contribuyen a múltiples funciones del sudor, dichas sustancias están ligadas a enfermedades o pueden ser utilizadas para monitorear el estado fisiológico del ser humano. Las prácticas comunes de detección de metabolitos en el cuerpo son intrusivas, es decir, requieren perforaciones o introducir algún objeto al cuerpo humano, lo que conlleva el riesgo de infecciones.

Se han desarrollado actualmente técnicas y dispositivos enfocados al análisis, monitoreo y mejora de la salud, sin embargo, la mayoría estas tecnologías aún son intrusivas o requieren de una manipulación previa de la muestra. Existen proyectos enfocados a utilizar biosensores no intrusivos, por lo que se ha podido realizar el monitoreo de ciertos biomarcadores de forma más cómoda para paciente.

2.9 Glucosa

La glucosa es un compuesto biológico el cual es un reactivo principal en la glucólisis, es también responsable de la respiración tanto aeróbica como anaeróbica para la generación de energía. En plantas y algunas bacterias es producida a partir de agua y dióxido de carbono mediante fotosíntesis y es condensada en forma de almidón (Galant et al., 2015), por lo cual, se han desarrollado diversos métodos para analizar la glucosa y el diagnóstico de la diabetes.

La glucosa pertenece al grupo de carbohidratos o hidratos de carbono, los cuales son clasificados entre los compuestos orgánicos más abundantes en la naturaleza. Es un monosacárido de seis carbonos perteneciente al grupo de los polihidroxi aldehidos o aldosas, pues poseen un grupo aldehído. De igual manera, tiene dos enantiómeros, la D-glucosa y la L-glucosa, siendo el enantiómero de D-*glucosa* el que es encontrado en la naturaleza. Su ciclación da dos hemiacetales los cuales son: la D- *glucofuranosa* o la D-*glucopiranososa* (R A Escalona-Villalpando et al., 2016).

Una de las enfermedades con mayor número de pacientes es la Diabetes, se estima que aproximadamente 150 millones de personas en el mundo tienen este padecimiento (Heller & Feldman, 2008). La enfermedad consiste en una concentración anormal de glucosa en sangre y tejidos, en personas sanas se encuentra entre 70 y 120 mg/dL (4 y 8 mM), por otro lado, las personas que padecen diabetes el rango es más amplio, aproximadamente entre 30 y 500 mg/dL (2 y 30 mM). Es por esto que el estudio de métodos para monitorizar la concentración de glucosa y diagnosticar la enfermedad va en aumento (Kim, Campbell, & Wang, 2018).

La *diabetes mellitus* es una enfermedad crónica provocada por una baja producción de insulina, por la resistencia a ella o ambas. La insulina es una hormona que produce el páncreas

con el objetivo de controlar la concentración de glucosa en sangre. Actualmente existen tres tipos principales de diabetes los cuales son (Classification, 2014):

Diabetes tipo 1: Es diagnosticada generalmente en niños; el cuerpo produce una cantidad insuficiente de insulina debido a la destrucción de células del páncreas.

Diabetes tipo 2: Es diagnosticada comúnmente en adultos; consiste en una respuesta de rechazo hacia la insulina producida por el páncreas.

Diabetes gestacional: Se diagnostica durante el embarazo.

En caso de no monitorear con frecuencia los niveles de glucosa en sangre esta enfermedad puede tener consecuencias crónicas a largo plazo. Los efectos más graves, son provocados por hipoglucemia e incluyen desmayos, coma o incluso muertes.

2.10 Glucosa en sudor

El principal componente del sudor es el cloruro de sodio, su valor es aproximadamente de 350 mg /dL, mientras que la glucosa se encuentra en concentraciones significativas de 5 a 20 mg/dL y se correlaciona con la concentración de glucosa en la sangre. Para pacientes diabéticos, puede superar los 100 mg /dL, sin embargo, el sudor es producto de tres fuentes diferentes: secreción de glándulas ecrinas, secreción de glándulas apocrinas y difusión pasiva del agua por lo que la composición del sudor varía en relación con la parte del cuerpo (Olarte et al., 2013).

3.Hipótesis

El desarrollo de un biosensor de glucosa flexible dérmico capaz de cuantificar la glucosa en sudor y su posterior acoplamiento a un dispositivo electrónico permitirá su continuo sensado a partir de un dispositivo móvil.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Desarrollar un sensor flexible acoplado a un dispositivo electrónico inalámbrico para la cuantificación de glucosa en sudor.

4.1 Objetivos Particulares

- 1) Evaluar métodos de inmovilización de la enzima glucosa oxidasa usando nanopartículas de carbón y/o mediadores electroquímicos.
- 2) Caracterizar los electrodos derivados de la enzima glucosa oxidasa por técnicas microscópicas, fisicoquímicas y electroquímicas.
- 3) Optimizar las condiciones de operación de un sensor de glucosa como pH, temperatura, estabilidad y rango lineal por técnicas electroquímicas.
- 4) Diseñar y evaluar un sensor en un material flexible simulado y sudor humano.
- 5) Diseñar el dispositivo electrónico tipo inalámbrico.
- 6) Acoplar el o los biosensores flexibles de glucosa al dispositivo electrónico inalámbrico y evaluar su funcionamiento.

5. Metodología

Materiales y métodos

Se utilizó Glucosa Oxidasa (E.C: 1.1.99.10 *Aspergillus* sp., GLDE-70-1191) adquirida de Sekisui Diagnostics (Reino Unido). Papel de carbón Toray de Fuel Cell Earth (EE. UU., TGP-H-060), nanotubos de carbono con un diámetro de 10-20 nm. La solución de tampón fosfato (PBS por sus siglas en inglés phosphate buffer solution) se preparó usando K_2HPO_4 y KH_2PO_4 de J. T. Baker.

5.1 Preparación del electrodo del papel toray

Para las mediciones electroquímicas se recortaron tiras de 3 x 0.3 cm de papel carbón Toray, cada una fue sumergida en parafina por medio minuto dejando sin sumergir una superficie de 0.3 x 0.5 cm.

5.2 Preparación del Glutaraldehído

Se preparó una concentración de GA al 4.5% en Buffer de fosfatos pH 7.4 a partir de GA al 50 % .

5.3 Preparación de los electrodos derivados de GOx

5.3.1 Atrapamiento cross linking de GOx/MWCNT

Para realizar el atrapamiento en relación 1:1 molar se pesaron 0.5 mg de MWCNT y 0.5 mg de enzima Glucosa Oxidasa, a la enzima se le agregaron 100 μ L de PBS con pH 7.4 y se agitó en el vortex por 1 min, posteriormente los 100 μ L se agregaron a los MWCNT y se agitaron por 30 segundos para posteriormente sonicarlos por 3 min, este procedimiento se repitió 5 veces. Para preparar las Concentraciones 2:1 y 10:1 se utiliza el mismo procedimiento solo que se pesan 0.3 mg de MWCNT y 0.6 mg de Glucosa Oxidasa y 0.25 mg de MWCNT y 2.5 mg de Glucosa Oxidasa, respectivamente (R.A. Escalona-Villalpando et al., 2018).

5.3.2 Atrapamiento con Fe₂O₃ cross linking de GOx/MWCNT/Fe₂O₃

Se utilizaron 0.3 mg de MWCNT, 0.3 mg de Fe₂O₃ y .6 mg de Glucosa Oxidasa, se agregaron 30 μ L de etanol al Fe₂O₃ y 15 μ L de PBS con pH 7.4 a la enzima, se agitaron por 1 min, posteriormente ambos se agregaron a los MWCNT y se le adicionaron 15 μ L de GA al 4.5%, se agitaron por 30 segundos para posteriormente sonicarlos por 3 min, este procedimiento se repitió 5 veces.

5.3.3 Atrapamiento cross linking con una biotinta de GOx

Se disolvieron 1.25 mg de FeCOOH en 4.25 ml de agua destilada (H_2O_{dest}), se calentaron por una hora a 95°C. Se agregaron 10 mg de PEI disueltos en 250 μ L de agua destilada y se centrifugaron 20 min a 14 rpm. Posteriormente se adicionaron 5 mg de Glucosa Oxidasa disuelta en 200 μ L de PBS con pH 7.4 y 800 μ L de INK, se agitó por 20 horas a 4°C y se le agregó 25 μ L de nafión modificado con TBAB (bromuro de tetrabutil amonio) (Werchmeister et al., 2019).

5.3.4 Atrapamiento cross linking con una biotinta de GO_x/PEI/MWCNT

Se disolvieron 1.5 mg de FeCOOH y .5 mg de PEI en 500 μ L de agua destilada y se colocaron 20 min en el sonicador, se le agregaron 2 mg de MWCN y se sonicó por 20 min más, posteriormente se colocó a baño maría por 2 horas a 170°C al terminar se sonicó por 20 min. De esta solución se tomaron 200 μ L los cuales se agregaron a 1 mg de glucosa oxidasa y se sonicó por 10 min.

5.3.5 Atrapamiento cross linking con Fe-PLL/GO_x/EDGE

Se prepararon 2 mg de PLL en 100 μ L de agua destilada y .25 mg de Glucosa oxidasa en 25 μ L de PBS pH 7.4, ambos se agregaron a 5 μ L de EDGE a 7.5% y se agitaron por 30 segundos para posteriormente sonicarlos por 3 min, este procedimiento se repitió 5 veces.

5.3.6 Atrapamiento cross linking de GO_x/MWCNT/GA/FcMeOH

Se disolvieron 0.5 mg de enzima Glucosa Oxidasa en 50 μ L de PBS con pH 7.4, 0.1 mg de FcMeOH en 50 μ L de Metanol, se juntaron en un tubo eppendorf con un volumen total de 100 μ L y se agitaron en el vortex por 5 min. Posteriormente, se tomó una alícuota de 75 μ L de la mezcla anterior y se agregaron a 0.5 mg de MWCNT junto con 25 μ L de GA al 4.5 %. Para facilitar en atrapamiento por cross-linking se sónico por 3 min y posteriormente se colocará en el vortex 30 segundos, este procedimiento se repetirá 5 veces.

5.4 Colocación de la solución en el electrodo

Con ayuda de una micropipeta se depositaron 20 μL de la solución en el área de 0.3 x 0.5 cm que se dejó sin parafina del electrodo. Posteriormente se dejaron secar a 4°C durante 24 horas.

5.5 Caracterización y mediciones electroquímicas

5.5.1 Sistema para evaluación de métodos electroquímicos

Se usó la configuración de tres electrodos: electrodo de trabajo (electrodo de papel carbón Toray junto con el depósito correspondiente al método evaluado), contra electrodo (barra de carbón grafito) y el electrodo de referencia (electrodo de Ag/AgCl). Se colocaron en un vaso de precipitado con tapa con 4 orificios de izquierda a derecha, se colocó el electrodo de trabajo, seguido por el de referencia y posteriormente el contra electrodo, por el orificio sobrante es por donde se agregaron las soluciones. Dentro del vaso se colocó también un agitador magnético y 5000 μL de PBS (0.1 M) con pH 7.4 y 5.6 según sea el caso de estudio (Figura 3). Los tres electrodos se conectaron a un potencióstato/galvanostato (Biologic) para poder realizar las pruebas electroquímicas (Retama, 2005) Todos los experimentos se realizaron por triplicado y a temperatura ambiente (25°C).



Figura 3 Sistema de electrodos colocados en el Potenciostato

5.5.2 Voltamperometría cíclica (VC)

Para evaluar los distintos métodos de atrapamiento se utilizó la técnica de VC para cada uno de ellos. Para los métodos de atrapamiento cross linking de GOx/MWCNT en diferentes relaciones estequiométricas y para el atrapamiento cross linking de GOx/MWCNT/Fe₂O₃ se realizó en un rango de potencial de -0.8 a 0 V a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} . Para los métodos atrapamiento cross linking con una biotinta de GOx , atrapamiento cross linking

con una biotinta de GOx/PEI/MWCNT y atrapamiento cross linking Fe-PLL/GOx/EDGE se realizó en un rango de potencial de -0.1 a .5 V a una velocidad de barrido de 5 mVs^{-1} y para el método atrapamiento cross linking de GOx/MWCNT/GA/FcMeOH se realizó en un rango de potencial de -0.1 a .7 V a una velocidad de barrido de 5 mVs^{-1} .

5.5.3 Cronoamperometría

Para evaluar la respuesta al aumento de glucosa se realizaron cronoamperometrías con y sin agitación. Para las que se realizaron con agitación se colocó el sistema de 3 electrodos en 5 ml de PBS con pH 7.5 y se les aplicó un potencial de 0.7 V, cada minuto se le realizó una adición equivalente a 1 mM de glucosa y entre cada adición se observó un aumento en la corriente, las adiciones se realizaron hasta la saturación del electrodo. Por otro lado, las cronoamperometrías que se hicieron estáticas se realizaron en el sistema de 3 electrodos en 5 ml de PBS con pH 7.5 y se les aplicó un potencial de 0.7 V y se dejaron por 5 min, posterior a los 5 min se agregó una concentración de glucosa de 0.5 mM y se dejó por 5 min más, este procedimiento se repitió hasta tener una concentración de glucosa de 5 mM.

5.6 Preparación del electrodo de referencia y contraelectrodo para parche flexible

La preparación del electrodo de referencia consistió en cortar una superficie de 3 x 0.3 cm de papel toray sobre la cual se depositó 1 μL de tinta de Nanopartículas de Plata en un área de 0.5 x 0.3 cm y se dejó secar por 72 h. Posteriormente, se colocó en la misma área 1 μL de FeCl_3 saturado y se dejó secar por 24 h. El contraelectrodo utilizado es una superficie de papel toray con dimensiones 3 x 0.3 cm.

Los tres electrodos se colocan sobre un parche médico de la marca Tegaderm® (Escalona-Villalpando et al., 2019) esto con el propósito de hacerlo flexible y viable para ser colocado sobre la piel.

5.7 Diseño electrónico del sensor

Para el diseño de la parte electrónica del biosensor se eligió usar un módulo Esp32 el cual tiene un DAC de 8 bits y un ADC de 12 bits, también tiene integrado un módulo de Wifi y bluetooth para una comunicación tipo Wireless. Además, sus dimensiones son de 3 x 5 cm lo que lo hace práctico considerando la aplicación que tendrá, es por esto que se optó por usar esta tarjeta programable.

Para poder procesar los datos obtenidos de la media celda es necesario convertir una señal analógica a digital para esto se escribió un programa en Python y se ajustó la resolución obteniendo 12 mV / escalón. Para poder obtener el nivel de glucosa con el biosensor es necesario incluir un potenciómetro en la parte electrónica para poder realizar las pruebas electroquímicas.

Se realizó la construcción del circuito en una protoboard Figura 4, por un lado tiene una configuración de seguidor de voltaje y de amplificador inversor conectado al DAC y al electrodo de referencia de la celda, lo que sirve para medir el circuito abierto, en el centro se tiene la configuración del circuito de randles, antes de conectar el contraelectrodo se tiene un MOSFET su función es no conectar el electrodo hasta que la celda este encendida, en el lado derecho del biosensor en la parte superior se tiene un inversor de voltaje el cual se usó para invertir el voltaje de salida del módulo Esp32 y en la parte inferior se tiene un inversor corriente voltaje para obtener el valor de corriente del sudor que se está midiendo en el parche.

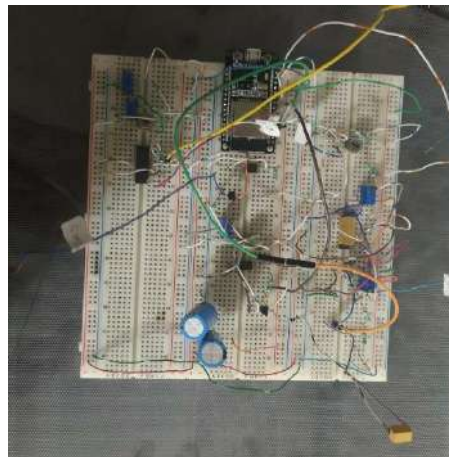


Figura 4 Diseño electrónico del biosensor

Por otro lado, se escribió un programa escrito en Python el cual se encarga de realizar las pruebas necesarias, primero enciende la celda, después lee un circuito abierto y almacena el dato, posteriormente realiza una voltamperometría cíclica y encuentra el voltaje más alto que es donde se encuentra el pico de oxidación, después resta el valor del pico y el valor de circuito abierto y con el resultado hace una cronoamperometría aplicándole ese potencial, por último, hace una cronocoulumbimetría. Estas pruebas dan como resultado un valor de corriente el cual se sustituye en la ecuación obtenida en la curva de calibración y de esta manera se obtiene el valor de glucosa

5.9 Diseño de aplicación para comunicación BT

Se programo el módulo ESP32 para recibir y enviar datos por medio de una aplicación BT. Por otro lado, se desarrolló una aplicación en APP inventor la cual está instalada en un teléfono inteligente y cuenta con una interfaz que interactúa con el usuario. En una primera fase solicita el usuario y contraseña para garantizar la seguridad de la información Figura 5.

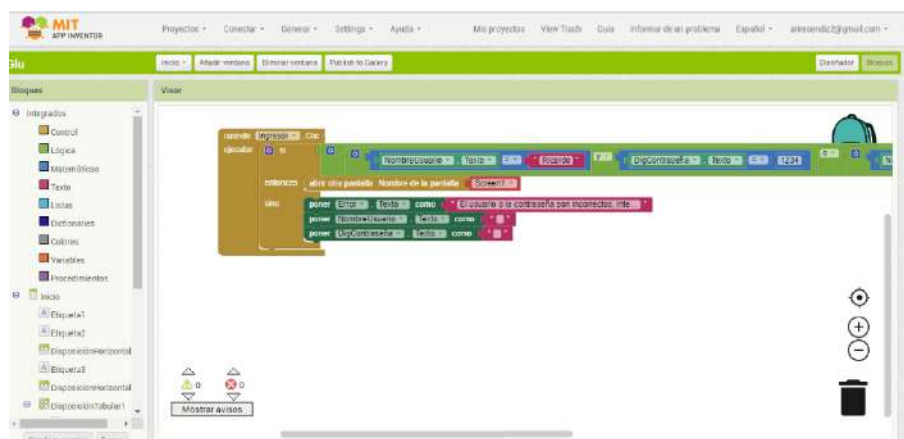


Figura 5 Diseño de bloques para la aplicación primera interfaz interactiva

Una vez proporcionados los datos de seguridad el usuario debe conectar su teléfono inteligente al biosensor mediante los modulos BT que ambos poseen, seguido de esto debe dar click en el botón “iniciar” y es cuando el Biosensor recibe la orden de empezar a realizar las pruebas electroquímicas y obtiene el valor de glucosa , este dato lo envía por BT a la aplicación y el usuario puede ver en la pantalla el nivel de glucosa en sangre que tenía al momento de hacer la medición (Figura 6).



Figura 6 Segunda interfaz interactiva con el usuario

6. Resultados y discusión

6.1 Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa usando nanopartículas de carbón y mediadores electroquímicos.

Existen diferentes métodos para lograr la inmovilización de GOx a una superficie de carbón, el más sencillo es con un depósito directo sobre dicha superficie, la unión se logra mediante interacciones electrostáticas débiles, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van Der Waals. En este primer apartado se muestran los resultados de diferentes métodos de inmovilización de GOx sobre una superficie de papel toray.

6.1.1 Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa con MWCNT en diferentes proporciones

Con base a resultados y experiencia del grupo de trabajo por trabajar con nanotubos de carbono se eligió utilizarlos, pero con otro tipo de longitudes y modificaciones (R.A. Escalona-Villalpando et al., 2018) (Ricardo A Escalona-Villalpando et al., 2019). Los electrodos de papel toray previamente preparados y depositados como se explica en la

metodología, fueron colocados en una media celda electroquímica donde se agregaron 5 ml de una solución amortiguadora de PBS (0.1M) con un pH de 7.4. Se verificó la respuesta de GOx por amperometrías a un potencial de 700 mV s⁻¹ que es el potencial de oxidación del peróxido (Ricardo A Escalona-Villalpando et al., 2019) .

En la Figura 7 a) se muestran los amperogramas obtenidos con este método de inmovilización, se puede observar cómo existe un incremento de corriente con cada adición de 1 mM de glucosa, las primeras adiciones tienen incrementos de 70 nA con lo que se puede comprobar que existe una respuesta en la presencia de glucosa (Figura 7 b), sin embargo, el aumento en la corriente es bajo en comparación a métodos reportados en previos trabajos en el grupo de trabajo (Escalona-Villalpando et al., 2019) por lo que se probó una relación 2:1 de la enzima GOx y MWCNT como se muestra en la **Figura 8**.

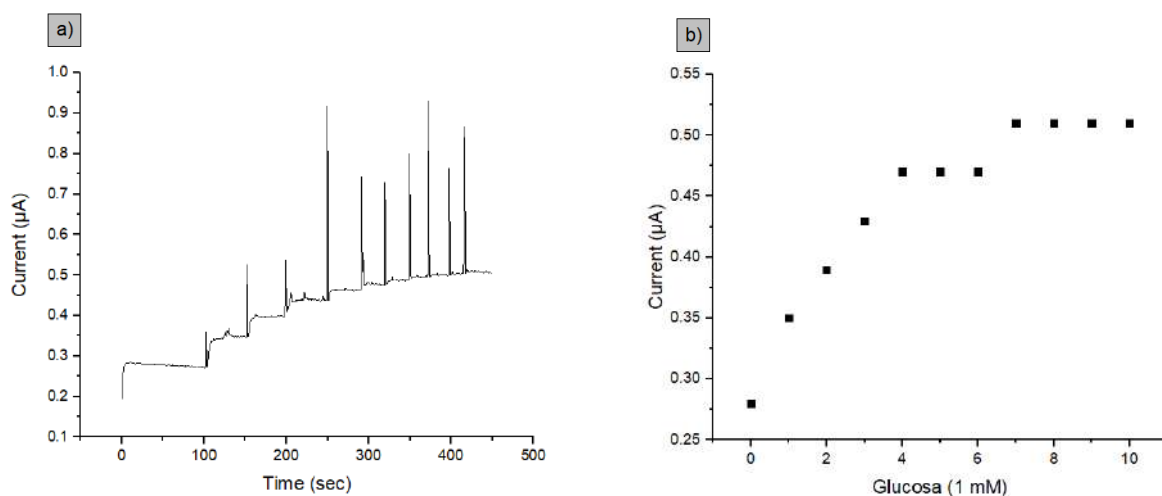


Figura 7 a) Amperometría a electrodo de MWCNT-(GOx) en relación 1:1 vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 700 mV con adiciones de 1 mM de glucosa b) Concentración de glucosa vs corriente obtenida por amperometría a electrodo de MWCNT-(GOx) en relación 1:1 vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 700 µA con adiciones de 1 mM de glucosa

Con el atrapamiento de GOx y MWCNT en relación 2:1 respectivamente se puede observar como en la primera adición de 1 mM de glucosa se tiene un incremento en la corriente de 0.57 µA, en la segunda adición se obtiene un incremento de corriente mucho mayor pues es de 4.57 µA y con las siguientes adiciones sigue aumentando la corriente en promedio 2.29 µA por cada adición. Se puede decir que al aumentar la cantidad de enzima se tuvo mayor aumento en la corriente, aparte de que se obtuvo un electrodo más estable, sin embargo, los

incrementos de corriente no son constantes y es por esto que se optó por probar el mismo método, pero con una relación de 10:1 GOx y MWCNT respectivamente.

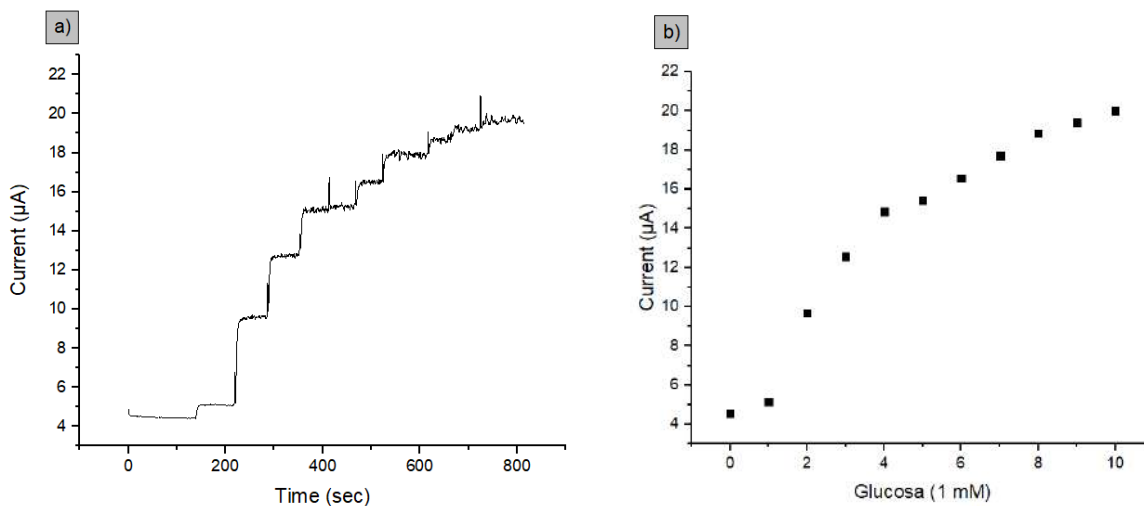


Figura 8 a) Amperometría a electrodo de MWCNT-(GOx) en relación 2:1 vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 700 mV con adiciones de 1 mM de glucosa. b) Concentración de glucosa vs corriente obtenida por amperometría a electrodo de MWCNT-(GOx) en relación 2:1 vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 700 µA con adiciones de 1 mM de glucosa

Al tener una relación 10:1 de GOx / MWCNT se esperaba tener mayores incrementos de corriente, esto debido a la cantidad de enzima con la que se trabajó, en la Figura 9 se observa como las primeras dos adiciones de glucosa presentan un incremento de .61 µA, las adiciones posteriores únicamente tienen un aumento de 0.24 µA entre ellas, al final la corriente no logró estabilizarse, ni presentó un aumento significativo a pesar de seguir haciendo las adiciones. Este comportamiento del electrodo se debe a la cantidad de enzima utilizada pues se aglomeró alrededor de los MWCNT bloqueando los sitios activos de la enzima lo que impide el intercambio de electrones y por ende el aumento de la corriente.

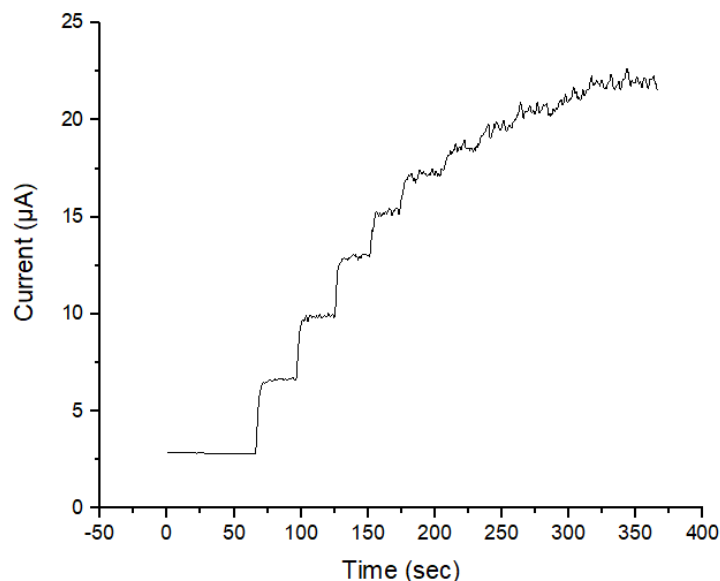


Figura 9 Amperometría a electrodo de MWCNT-(GOx) en relación 10:1 vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 700 mV con adiciones de 1 mM de glucosa

De las tres relaciones de GOx y MWCNT probadas para este trabajo la que demostró tener grandes aumentos de corriente fue la 2:1 y una señal más estable. Sin embargo, en la relación 10:1 los aumentos de corriente fueron más constantes, aunque significativamente menores. Sin embargo, en las tres relaciones se pudo observar una respuesta a la presencia de glucosa lo que indica que el biosensor está funcionando.

6.1.2 Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa con MWCNT y Fe₂O₃

Las nanopartículas de óxido de hierro (III) son caracterizadas por tener propiedades magnéticas, tienen una superficie grande lo que permite utilizarse como soporte para la inmovilización de diversas moléculas como proteínas, enzimas, fragmentos de ADN,(Gubin, 2009) Aunado a esto, tienen una baja toxicidad y pueden utilizarse en el desarrollo de productos biocompatibles en diversas áreas como biotecnología, ambiental, medicina, entre otras (Wooster, 1972).

Las nanopartículas magnéticas poseen un núcleo de óxido de hierro el cual tiene un comportamiento super paramagnético, la superficie puede ser recubierta con materiales orgánicos o inorgánicos que por una parte hacen que el producto sea biocompatible y por

otra permiten funcionalizarlo con diversos materiales como enzimas, anticuerpos o medicamentos para realizar una función específica (Gregorio-Jáuregui et al., 2012).

Los electrodos de papel toray previamente preparados y depositados como se explica en la metodología, fueron colocados en una media celda donde se agregaron 5 ml de una solución amortiguadora de PBS (0.1M) con un pH de 7.4. Se verificó la respuesta de GOx en los electrodos, primero se realizaron amperometrías en agitación, sin embargo, no se observaron incrementos significativos en la corriente y es por eso que se eligió realizar amperometrías estáticas a un potencial de 700 mV s^{-1} durante un tiempo de 300 segundos, se realizaron 9 adiciones de glucosa a 1 mM. Se obtuvieron los resultados presentados en la Figura 10. Como se puede observar existe un aumento de la corriente entre cada una de las adiciones, además de presentar un corriente estable, los incrementos en las primeras 5 adiciones son de $0.24 \mu\text{A}$ aproximadamente, lo que demuestra una buena respuesta del sensor, pero aún sigue siendo bajas con respecto a otros resultados reportados.

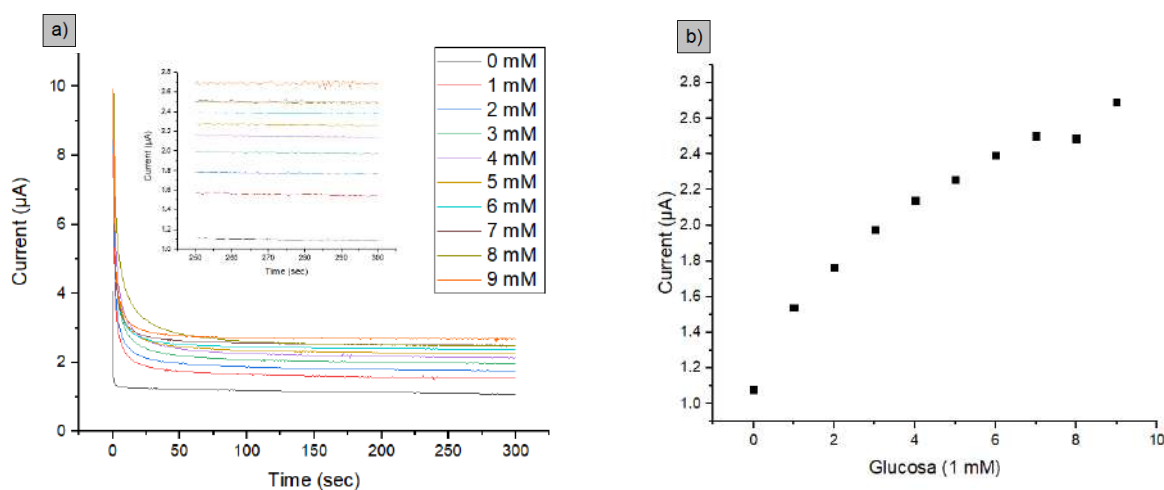


Figura 10 a) Amperometría a electrodo de MWCNT-GOx-Fe₂O₃ vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 700 mV con adiciones de 1 mM de glucosa. b) Concentración de glucosa vs corriente obtenida por amperometría a electrodo de MWCNT-GOx-Fe₂O₃ vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 700 µA con adiciones de 1 mM de glucosa

A pesar de tener incrementos de corrientes constantes y buena estabilidad, el incremento total de corriente es de $1.61 \mu\text{A}$, teniendo un valor de corriente final después de 9 adiciones de glucosa de $2.69 \mu\text{A}$ la cual es una corriente muy baja indicando una baja sensibilidad, y teniendo bajo indicadores para la arquitectura electrónica del sensor.

6.1.3 Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa con biotina de GOx

La elección de este método se basó en un trabajo previamente realizado (Werchmeister et al., 2019) donde se optimiza el uso de biotintas de GOx como mediador, dicha biotinta está compuesta por la enzima glucosa oxidasa y ferroceno carboxilado en una matriz de polimerización de polietilenimina (PEI). Se reporta una buena conducción electrónica, un rango lineal amplio y una sensibilidad relativamente baja de $0.20 \mu\text{A mM cm}^2$ esto debido al efecto de difusión.

Para probar este método se preparó una media celda electroquímica donde se agregaron 5 ml de una solución amortiguadora de PBS (0.1M) con un pH de 7.4. Se verificó la respuesta de GOx en los electrodos por medio de voltamperometrías cíclicas con una ventana de trabajo de -100 mV hasta 500 mV. Como se puede observar en la Figura 11 en color negro se tienen las voltamperometrías realizadas sin glucosa en donde se ve ligeramente un pico de potencial a 220 mV aproximadamente, en color rojo están las voltamperometrías cíclicas con presencia de glucosa se aprecia un incremento considerable en la corriente y de igual manera se observa un pico de potencial a 220 mV.

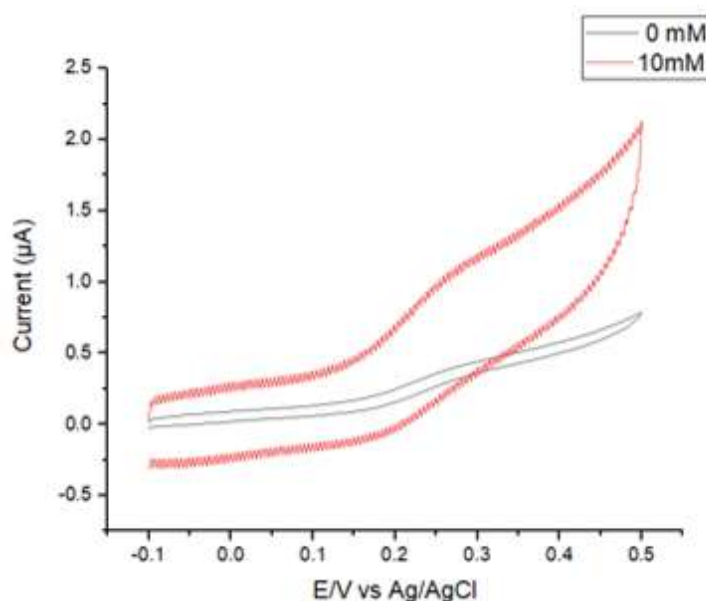


Figura 11 Voltamperometría cíclica a electrodo de biotinta de GOx vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 5 mVs^{-1} sin agitación

También se realizaron amperometrías a un potencial de 700 mVs^{-1} para evaluar la respuesta del electrodo obteniendo los resultados presentados en la Figura 12, se puede observar una buena estabilidad de corriente, sin embargo, en las primeras adiciones el aumento de corriente no es tan significativo, después de adicionar 4 mM de glucosa la corriente empieza a subir sin embargo no logra mantenerse pues tiende a bajar hasta que se le agrega una nueva concentración, esto se debe al método de atrapamiento al ser una biotinta se tiene ferroceno carboxilado en una matriz de policationes de polietilenimina (PEI) y GOx, al ser un atrapamiento por cross linking se encuentra todo aglomerado lo que ocasiona un bloqueo en el centro activo de la enzima, además el depósito de la biotinta no logra tener un buen contacto con el papel toray y es por esto que se tienen esas caídas de corriente (Werchmeister et al., 2019).

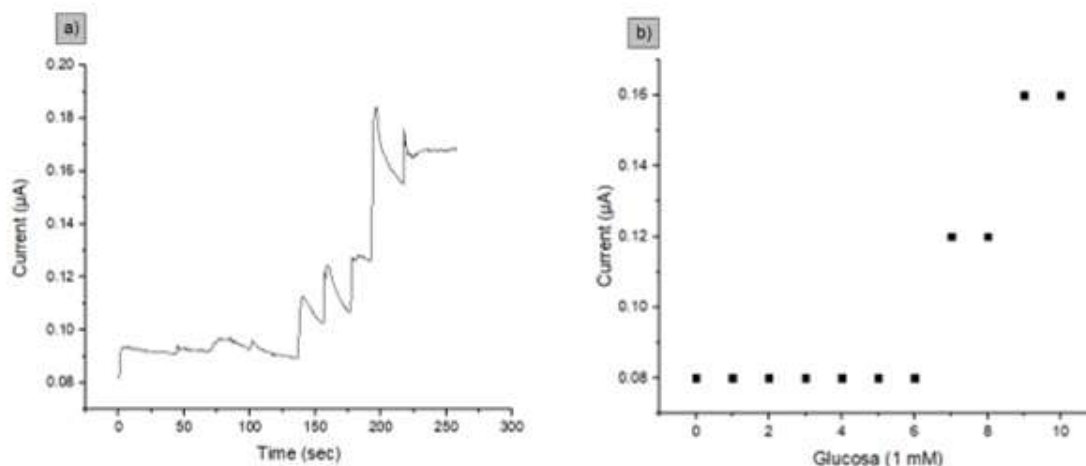


Figura 12 Amperometría a electrodo de biotinta de GOx vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 700 mV con adiciones de 1 mM de glucosa b) Concentración de glucosa vs corriente obtenida por amperometría a electrodo de biotinta de GOx vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 700 μA con adiciones de 1 mM de glucosa.

A pesar de mostrar un buen aumento de corriente en la voltamperometría cíclica, en las amperometrías se puede observar que el aumento no es constante y tampoco se logra estabilizar después de las adiciones por lo tanto este método no puede ser usado para la realización de un biosensor amperométrico.

6.1.3 Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa con Fc-PLL y EDGE

Otro de los agentes cross-linking utilizados para inmovilización de la enzima glucosa oxidasa fue la opli-L-lisina (PLL). La PLL es un homopolímero formado por L-lisinas el cual posee propiedades anfífilas, está conformado por uno de los derivados de aminoácidos esenciales

y es biocompatible lo hace su uso factible para aplicaciones médicas. Se ha utilizado para la fijación de células, tejidos y enzimas, es por esto que es una opción factible para la inmovilización de GOx. La PLL posee un grupo amino libre por medio del cual interactúa con los grupos carboxilos más disponibles de GOx derivados del aspartato y glutamato (Hickey DP, Reid RC, Milton RD, 2016).

Los electrodos de papel toray previamente preparados y depositados como se explica en la metodología (sección 5.3.5), fueron colocados en una celda electroquímica donde se agregaron 5 ml de una solución amortiguadora de PBS (0.1M) con un pH de 7.4. Se verificó la respuesta de GOx en los electrodos por medio de voltamperometrías cíclicas con una ventana de potencial de -100 mV a 500 mV. En la figura 13 se observa en color gris la voltamperometría sin glucosa, se pueden ubicar los picos de oxidación y reducción del Fc-PLL en 220 mV y -100 mV respectivamente, también podemos apreciar en color rojo la voltamperometría en presencia de glucosa se puede notar el aumento de corriente existente como una típica respuesta por un mediador electroquímico.

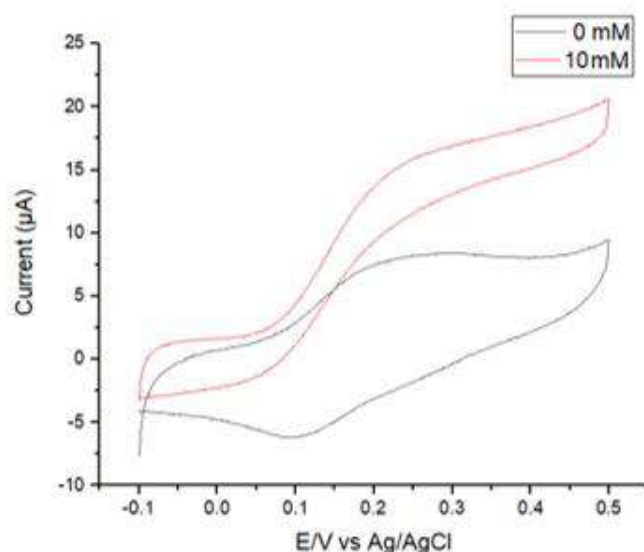


Figura 13 Voltamperometría cíclica a electrodo de Fe-PLL/GOx/EDGE vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 5 mVs⁻¹ sin agitación

Por otro lado, en las amperometrías realizadas a un potencial de 360 mVs⁻¹ con adiciones de glucosa de 1 mM de glucosa se puede observar una buena estabilidad del electrodo, sin embargo, existe muy poco aumento de la corriente y después de 3 mM de glucosa la corriente

aumenta y deja de ser estable lo cual puede deberse a una mala interacción entre el depósito de la enzima y el papel toray.

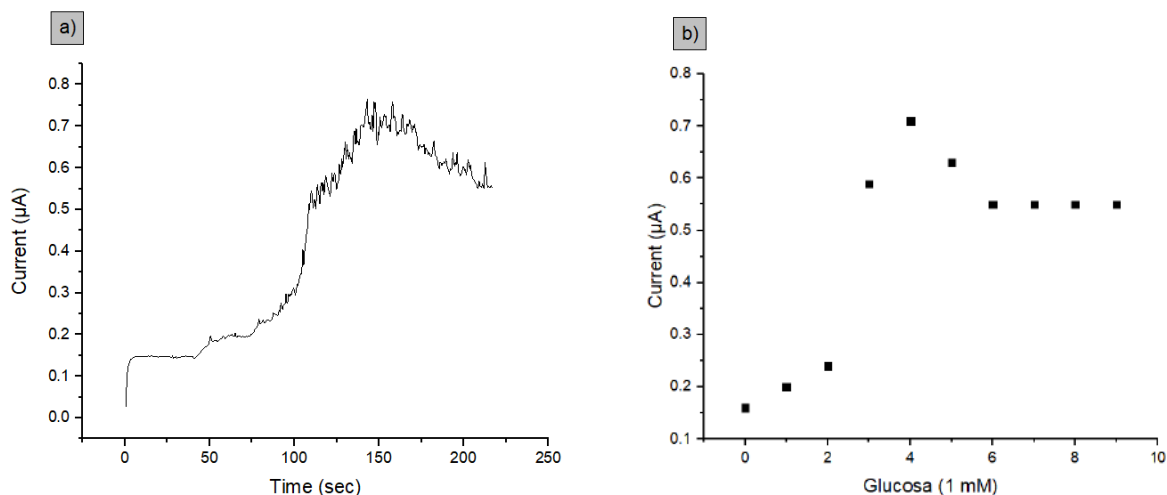


Figura 14 Amperometría a electrodo de PLL/GOx/EDGE vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 360 mV con adiciones de 1 mM de glucosa. b) Concentración de glucosa vs corriente obtenida por amperometría a electrodo de PLL/GOx/EDGE vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 700 μ A con adiciones de 1 mM de glucosa

A pesar de que en este método en la voltamperometría cíclica se observa un buen incremento de la corriente y los picos de oxidación y reducción están presentes, en las amperometrías con adiciones 1 mM de glucosa podemos observar que no hay una respuesta significativa entre cada adición y que incluso después de 3 mM de glucosa el sistema ya no logra estabilizarse, es por eso que se optó por probar otro método.

6.1.3 Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa con MWCNT/ FeMeOH /GA

Con este método se busca tener una transferencia más rápida desde el sitio activo de GOx, para esto se utiliza como mediador redox el FcMeOH el cual transporta electrones entre el sitio activo de la enzima y la superficie de los electrodos (Gracia & Mecerreyes, 2013), la incorporación de MWCNT permite un mejor contacto eléctrico entre los sitios activos de la enzima además de aumentar el área para anclar GOx, y su tamaño relativamente pequeño les permite situarse en las proximidades de cofactor de las enzimas y reducir las distancias de túnel de electrones.

Los electrodos de papel toray previamente preparados y depositados como se explica en la metodología, fueron colocados en una celda electroquímica donde se agregaron 5 ml de una solución amortiguadora de PBS (0.1M) con un pH de 7.4. Se realizaron voltamperometrías cíclicas con una ventana de potencial de -100 mv a 700 mV para observar los picos de reox del mediador, que en este caso es el ferroceno. El voltamperomgrama obtenido se muestra en la **Figura 15** la voltamperometría mostrada en color negro es en ausencia de glucosa se puede observar el pico de oxidación en 360 mV y el de reducción en 100 mV, similar a lo reportado por otros autores, en la voltamperometría de color rojo realizada después de adicionar glucosa se muestra como existe un aumento en la corriente además de ver con mayor claridad el pico de oxidación en 360 mV y el de reducción en 100 mV, lo que demuestra que los picos no se están recorriendo únicamente está aumentando aproximadamente 20 μA la corriente.

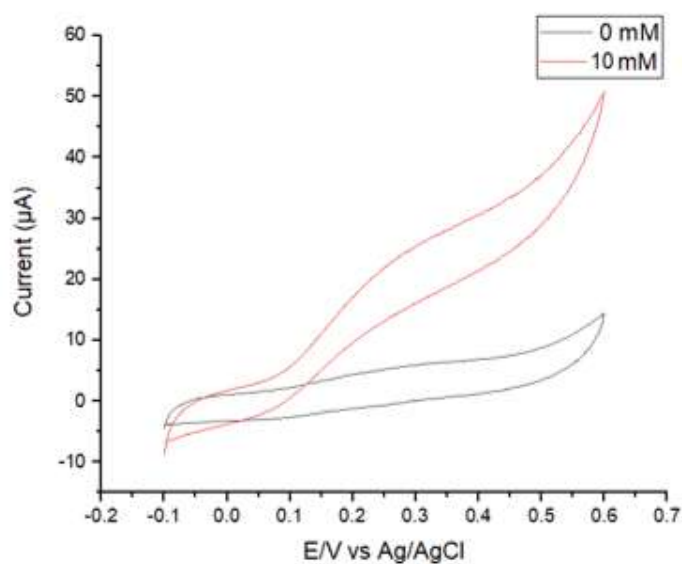


Figura 15 Voltamperometría cíclica a electrodo de GOx/MWCNT/ FeMeOH / GA vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 5 mVs⁻¹ sin agitación

Observando el buen incremento de la corriente catalítica de este método en comparación con los anteriores, se prosiguió a realizar amperometrías en agitación obteniendo el amperograma presentado en la Figura 16 donde se puede observar cómo se tiene una estabilidad en la corriente, se realizaron adiciones de glucosa 1 mM y se obtuvieron aumentos proporcionales de corriente aproximadamente de 1.57 μA , por lo que se obtuvo la relación que al adicionar

1 mM de glucosa la corriente aumenta 1.57 μA , además, la corriente se mantiene estable entre cada aumento y alcanza una corriente máxima de 23.23 μA .

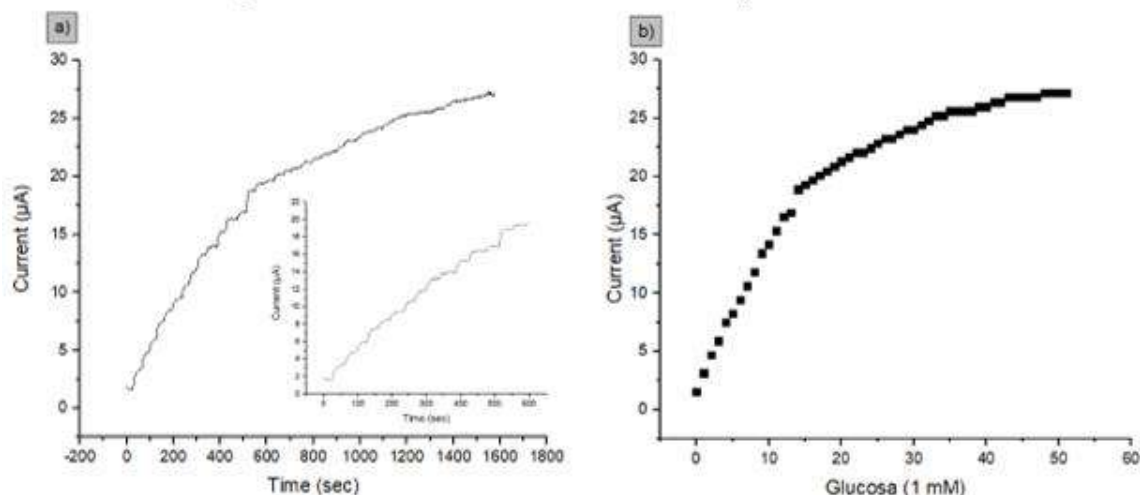


Figura 16 Amperometría a electrodo de GOx/MWCNT/ FcMeOH /GA vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 360 mV con adiciones de 1 mM de glucosa. b) Concentración de glucosa vs corriente obtenida por amperometría a electrodo de GOx/MWCNT/ FcMeOH /GA vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4 a 700 μA con adiciones de 1 mM de glucosa.

Debido a la buena respuesta de este método de inmovilización a las adiciones de glucosa, se decidió utilizarlo para el atrapamiento de la enzima, pues presenta un buen incremento de corriente en las voltamperometrías cíclicas con presencia de los picos de oxidación en 360 mV y reducción en 100 mV, además de tener un aumento constante y proporcional en las adiciones de glucosa realizadas en las amperometrías por agitación como se muestra en la Figura 16.

Como se puede observar en la Figura 17 a) se tienen las pruebas de amperometrías en agitación a diferentes concentraciones de MWCNT y GOx, la concentración 1:1 (color gris) tuvo muy poco aumento de corriente, la concentración 10:1 (color azul) presento grandes cambios de corriente entre cada adición, sin embargo, presenta una desestabilidad en la corriente antes de llegar a la saturación, por otro lado, la concentración 2:1 tiene un menor aumento de corriente pero presenta una gran estabilidad por lo que se puede decir que de las 3 concentraciones la concentración 2:1 es la que mejor cumple con los criterios de estabilidad y aumento de corriente, sin embargo se tienen problemas de repetibilidad pues cuando se realiza el triplicado presenta un error .8 en promedio, además de que presenta una saturación aproximadamente a los 10 mM de glucosa.

En la Figura 17 b) se muestra la comparación de la respuesta de los electrodos que tienen biotinta de GOx, se realizaron pruebas con MWCNT y sin ellos, como se puede observar al tener MWCNT se tienen un aumento de corriente de 9 μA esto se debe a que los MWCNT proporcionan una superficie sobre la cual se puede anclar la enzima, además de participar en la conducción electrónica, sin embargo después de 4 mM de glucosa la corriente deja de ser estable esto se puede deber a que no se tiene una buena interacción entre la biotinta y el papel toray donde esta soportada y con la agitación la biotinta se empieza a desprender.

Por último, en la Figura 17 c) se tiene una comparación de las corrientes obtenidas cuando se usa como mediador el Ferroceno, se puede observar el conjunto de MWCNT-FcMeOH-GA-GOx presenta un buen incremento de corriente con cada adición en comparación al resto de los métodos, además se satura hasta tener 32 mM de Glucosa en el sistema y la corriente del sistema es estable, es por esto que se decidió usar este método para realizar el biosensor.

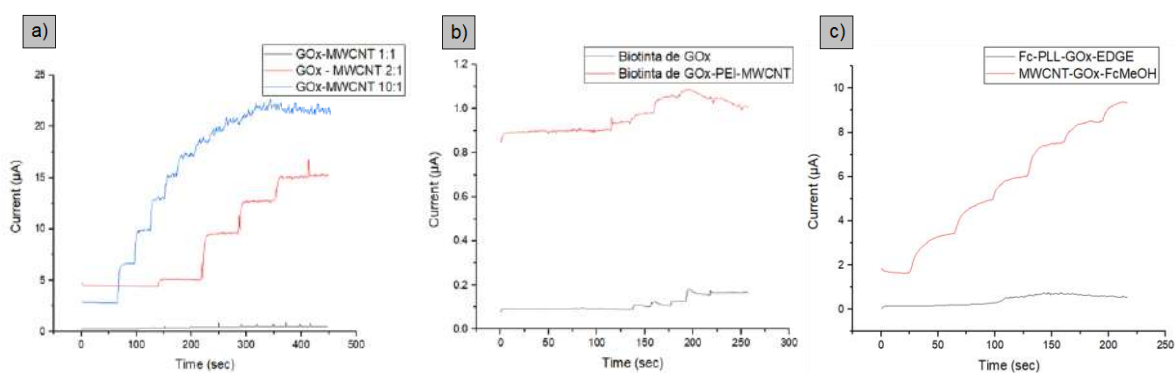


Figura 17 Amperometría a electrodos vs Ag/AgCl en PBS pH 7.4. a) comparación de corrientes de electrodos con GOx-MWCNT a diferentes proporciones. comparación de corrientes de electrodos de biotinta de GOx. c) comparación de corrientes de electrodos de MWCNT-FcMeOH-GOx

6.2 Caracterización del método de inmovilización de GOx con MWCNT, GA y FcMeOH

Una vez elegido el mejor método de inmovilización de la enzima glucosa oxidasa se volvieron a realizar las pruebas electroquímicas pero esta vez en un PBS con pH 5.6, ya que es el pH objetivo del trabajo por ser el promedio encontrado en el sudor, y la directriz del trabajo está enfocado en la cuantificación de glucosa en las concentraciones encontradas en el sudor humano entre 1.1-2 mM (Abellán Llobregat, 2017). En la **Figura 18** se puede observar el amperograma obtenido con la nueva variación de pH, se tiene un total de corriente de 29.13 μA , con un aumento promedio de 2.49 μA por cada adición de 1 mM de glucosa.

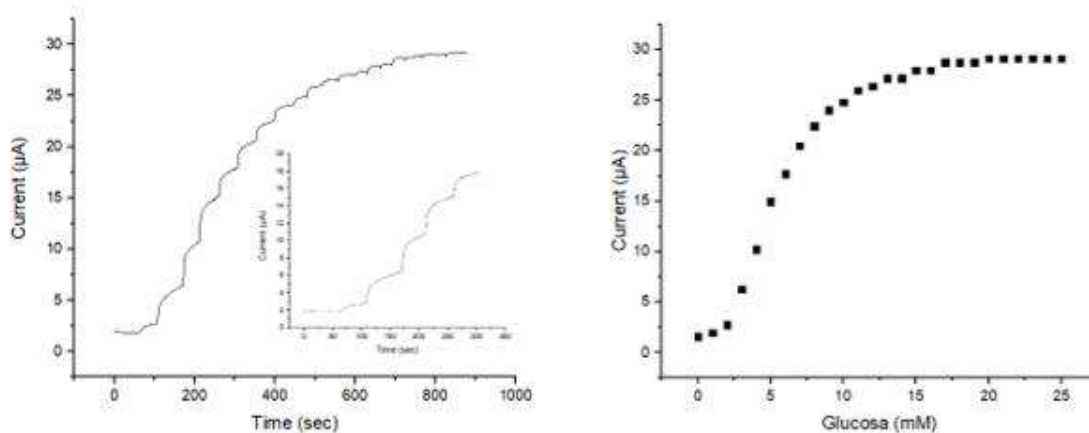


Figura 18 Amperometría a electrodo de GOx/MWCNT/ FcMeOH /GA vs Ag/AgCl en PBS pH 5.6 a 360 μ A con adiciones de 1 mM de glucosa

Al comparar la respuesta obtenida con los diferentes pH (Tabla 1) en las primeras dos adiciones de glucosa se tiene un mayor aumento de corriente a un pH 7.4, sin embargo, a partir de una concentración de 3 mM de glucosa el electrodo que presenta mayores incrementos de corriente es el que tiene un pH de 5.6 (figura 19) con lo que se demuestra que el método de inmovilización de GOx/MWCNT/ FcMeOH /GA trabaja mejor a pH ligeramente ácidos, esto podría deberse a que la enzima GOx presenta mayor actividad entre los rangos de pH de 3- 6.5 y es por esto que al cambiar el rango de pH se obtiene una mejor respuesta

Glucosa (mM)	Corriente (μ A) en PBS pH 5.6	Corriente (μ A) en PBS pH 7.4
0	1.57	1.57
1	1.97	3.15
2	2.76	4.72
3	6.3	5.91
4	10.24	7.48
5	14.96	8.27
6	17.72	9.45
7	20.47	10.63
8	22.44	11.81
9	24.02	13.39
10	24.8	14.17

Tabla 1 comparativa de corrientes obtenidas con diferentes pH

Los niveles de glucosa en sudor van de 5.6 μM hasta 2.2 mM (Harvey, LeBouf, & Stefaniak, 2010)(Abellán Llobregat, 2017), con una concentración de 2 mM en un pH de 5.6 se tiene una corriente de 2.76 μA y para un pH de 7.4 se tiene una corriente de 4.72 μA para la misma concentración de glucosa. Si bien a un pH ligeramente ácido, se tienen corrientes menores en pocas adiciones de glucosa aun así la respuesta del sensor es muy buena.

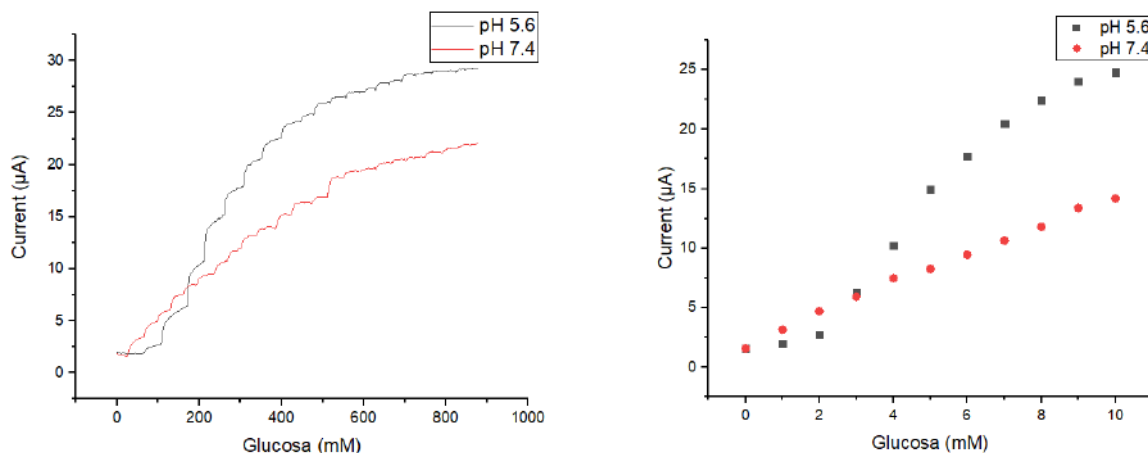


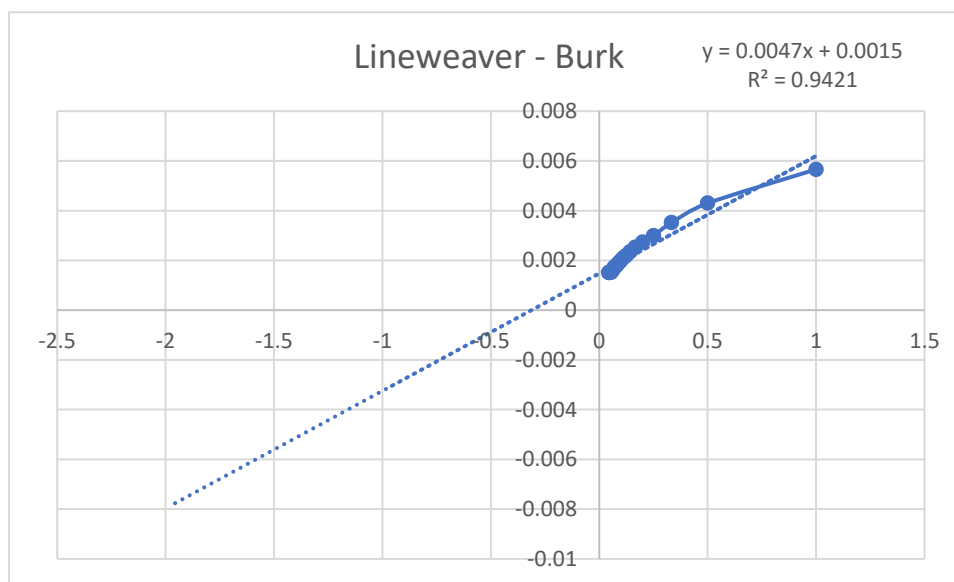
Figura 19 Comparativo de respuesta de electrodo de $\text{GOx/MWCNT/FcMeOH/GA}$ vs Ag/AgCl en PBS pH 5.6 (negro) y 7.4 (rojo)

Se realizaron los cálculos cinéticos utilizando la ecuación de Lineweaver-Burk para el cálculo de la constante de Michaelis-Menten (k_m), en las abscisas se encuentra la inversa de la concentración de sustrato y en las ordenadas se tiene la inversa de la intensidad de corriente obtenida. A partir de la ordenada al origen se calcula el valor de V_{max} y con la pendiente de la recta se calcula k_m (Thangamuthu, Pan, & Chen, 2011).

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\text{max}}} + \frac{K}{V_{\text{max}}S}$$

Graficando la inversa de los valores de corriente obtenidos por cada adición de glucosa se obtiene la Grafica 1 de donde podemos obtener la ecuación de la recta que en este caso es $y = .0047x + 0.0015$, con el inverso del valor del término independiente se puede calcular la velocidad máxima (V_{max}) de la reacción la cual se obtiene cuando la velocidad de reacción se hace dependiente de la concentración de sustrato, en este caso V_{max} tiene un valor de 666.666 $\mu\text{A cm}^{-2}$.

La constante de Michaelis (K_m) indica la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima y la afinidad que tiene la enzima por el sustrato, mientras menor sea el valor de K_m menor es la cantidad de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima, por lo que mayor será la afinidad de la enzima hacia el sustrato. El valor de K_m obtenido es de 3.133 m M (López, 1959).



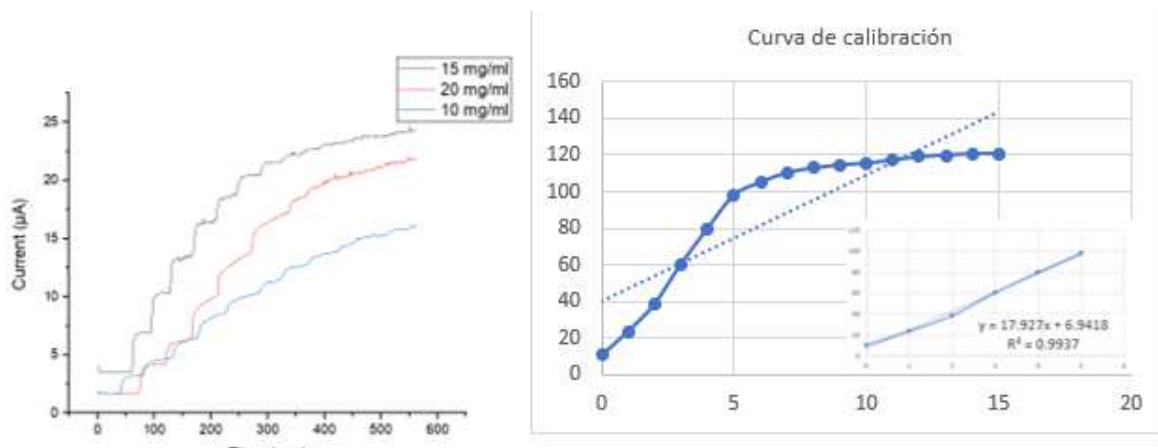
Gráfica 1 Ecuación de Lineweaver – Burk de sensor de glucosa

Dentro de los parámetros analíticos que suelen estudiarse en los biosensores se tiene la sensibilidad, intensidad de corriente máxima, intervalo lineal, límite de detección y la repetibilidad. La sensibilidad se calcula a partir de la pendiente del intervalo lineal el cual corresponde en este trabajo a 0.0037. El cálculo para el límite de detección se basa en la relación señal/ruido = 3 y es la concentración mínima de un analito que se puede detectar, en este caso es de 0.2263. El límite de cuantificación por su parte corresponde a una concentración mínima de analito que puede medirse y tiene un valor de 0.7545. La intensidad de corriente máxima se expresa en forma de densidad de corriente relacionándolo con la superficie del electrodo, el sensor presenta una intensidad de corriente de $666.66 \mu\text{A cm}^{-2}$ (Abellán Llobregat, 2017).

6.3 Optimización del método de inmovilización de GOx con MWCNT, GA y FcMeOH

Para optimizar el desempeño de la reacción de oxidación de glucosa, se realizaron las pruebas descritas anteriormente variando las concentraciones de enzima (10, 15 y 20 mg ml⁻¹), la concentración de FcMeOH (1.5 y 2 mg ml⁻¹) y la concentración de MWCNT (5 y 10 mg/ml). Después de realizar las pruebas electroquímicas con los datos obtenidos se obtuvieron los valores de sensibilidad, rango lineal, límite de detección, límite de cuantificación, velocidad de reacción y corriente máxima para cada una de las concentraciones.

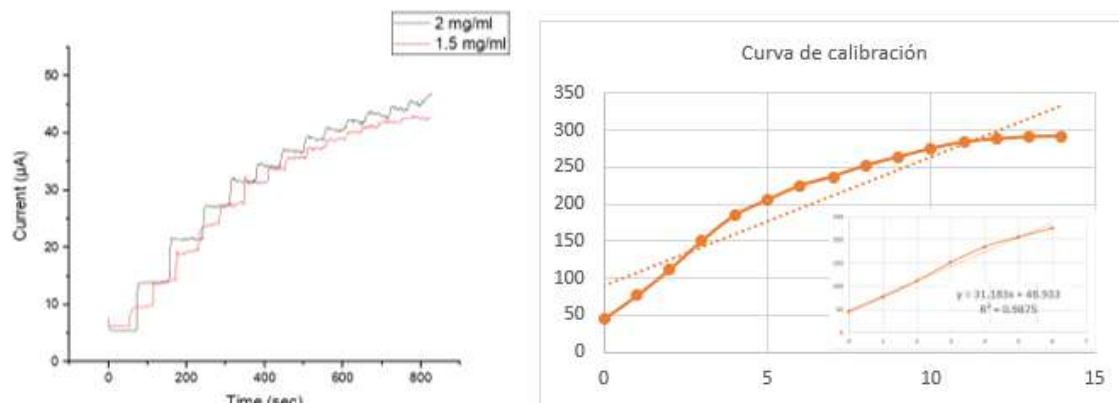
El primer factor que se varió fue la enzima porque es el elemento de reconocimiento, evaluado concentraciones de 10, 15 y 20 mg ml⁻¹. Los resultados de las amperometrías escalonadas muestran una mejor respuesta para la concentración de 15 mg ml⁻¹ teniendo un aumento de 3.5 μA en promedio y alcanzando la saturación hasta los 23 μA con un total de 22 mM de glucosa. Analizando los resultados obtenidos alcanza un rango lineal hasta 5 mM de glucosa con una R² de 0.99 con una Vmax de 217.39 μA cm⁻² y un km de 8.26 mM.



Gráfica 2 Izquierda comparación de amperometrías escalonadas de electrodos modificando la cantidad de enzima GOx (10, 15 y 20 mg ml⁻¹) vs Ag/AgCl en PBS pH 5.6. Derecha gráfica de concentración vs promedio de corriente.

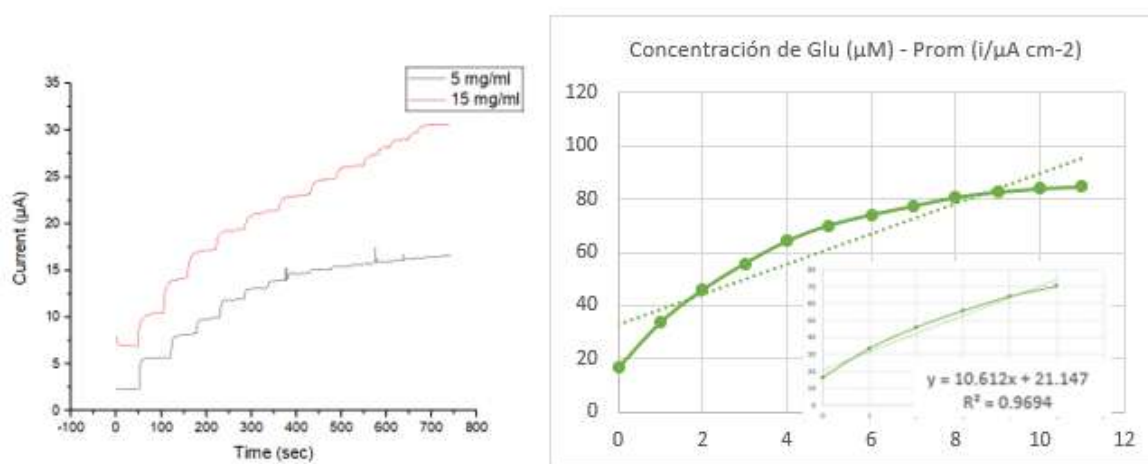
Una vez seleccionada la concentración ideal de la enzima, se realizaron variaciones en las concentraciones del mediador 1.5 y 2 mg ml⁻¹ de FcMeOH, obteniendo una mejor respuesta con la concentración de 2 mg/ml pues como se muestra en la gráfica 3 en las pruebas amperométricas escalonadas con esta concentración se tiene un aumento mayor en la corriente, con cada adición de 1 mM de glucosa se tiene en promedio un aumento de corriente de 2.3 μA. Los límites de detección y de cuantificación son menores siendo de 0.253 μA y

0.844 μA respectivamente, también presenta una buena velocidad de reacción al ser de 370.37 μM y un km de 4.03 mM aumentando también con respecto a la anterior.



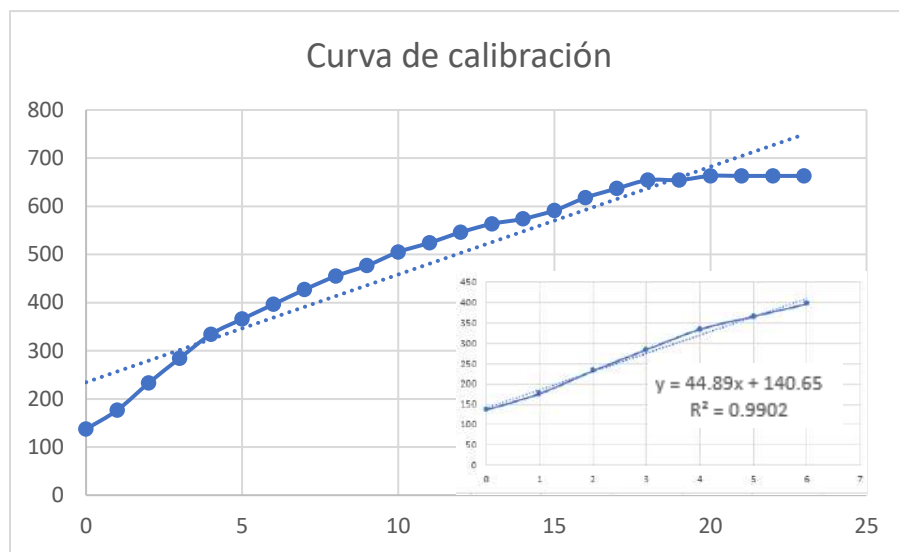
Gráfica 3 Izquierda comparación de amperometrías escalonadas de electrodos modificando la cantidad de FcMeOH (1.5 y 2 mg ml⁻¹) vs Ag/AgCl en PBS pH 5.6. Derecha gráfica de concentración vs promedio de corriente.

Finalmente se probaron dos concentraciones de MWCNT siendo una de 15 mg ml⁻¹ y la segunda de 5 mg ml⁻¹, la cual es la que se eligió, si bien es la que presenta una menor corriente máxima al ser de 98.039 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, su límite de detección es de 1.40 μA y su límite de cuantificación es de 4.66 μA , además de tener una velocidad de reacción de 2.009 μM . La concentración de 15 mg/ml presenta una mayor corriente al ser de 111.111 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ sin embargo sus límites de detección y de cuantificación son muy elevados de 11.42 y 38.08 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ respectivamente.



Gráfica 4 Izquierda comparación de amperometrías escalonadas de electrodos modificando la cantidad de MWCNT (5 y 15 mg ml⁻¹) vs Ag/AgCl en PBS pH 5.6. Derecha gráfica de concentración vs promedio de corriente.

Una vez obtenidas las concentraciones ideales del sensor se realizaron las pruebas antes mencionadas por triplicado a un pH de 5.6, con los datos obtenidos se realizó la curva de calibración (gráfica 5) en donde se puede observar la ecuación de la recta $y = 44.89x + 140.65$ y una R^2 de 0.99. También se calculó el resto de los parámetros, el sensor tiene un límite de detección de $0.22 \mu\text{A}$, un límite de cuantificación de $.754 \mu\text{A}$, una K_m de $4.083 \mu\text{M}$ y una corriente máxima de $833.33 \mu\text{A}/\text{cm}^2$.



Gráfica 5 Gráfica de concentración vs promedio de corriente

6.3 Pruebas de interferentes

Se realizó un análisis amperométrico para evaluar el efecto de diferentes sustancias presentes en el sudor que pudieran ser oxidadas por el potencial aplicado y causar alguna interferencia. El análisis de interferentes se realizó con electrodos comerciales en PBS con un pH de 5.6, se hicieron dos pruebas diferentes, una fue para interferentes en sangre y la segunda para interferentes en sudor. Realizar este análisis es de suma importancia para los biosensores de glucosa pues el sudor no sólo está compuesto de glucosa, también tiene diferentes electrolitos que pueden modificar la medición del analito de interés (Valdés-Ramírez et al., 2014).

Dentro de las sustancias que pueden interferir se encuentran el ácido úrico (UA), ácido ascórbico (AA) y la dopamina (DA), de acuerdo con la literatura revisada, las concentraciones aproximadas de dichas sustancias en el sudor son 0.2 mM de UA, 0.05 mM de DA y 0.01 mM de AA (Saleem et al., 2015). Por otro lado, las concentraciones

aproximadas en la sangre son 0.3 mM de UA, 0.06 mM de AA y 12 nM de DA. Al realizar el análisis se espera muy poca respuesta debido a la alta selectividad de la enzima.

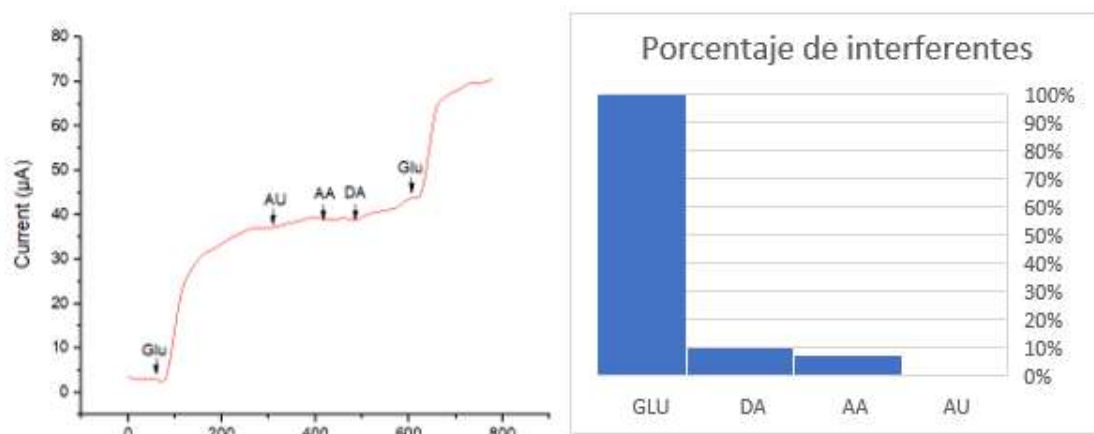


Figura 20 a) Amperometría a electrodo de MWCNT-FcMeOH (GOx) vs Ag/AgCl en PBS pH 5.6 a 360 mV. Adiciones de Glucosa con concentraciones para sangre (5 mM), AU (0.3 mM), AA (0.06 mM), DA (12 nM) y Glucosa (5mM) b) Gráfica de porcentaje de interferentes

En los resultados obtenidos en la prueba de interferentes en sangre se puede observar que no se muestra un aumento significativo en la corriente siendo este de 3.11% de AU, 6.98% de AA y 10% de DA. El sensor tiene una alta selectividad debido a que la enzima (GOx) únicamente oxida glucosa y ninguno de los interferentes tiene una estructura similar que pudiera generar interferencia.

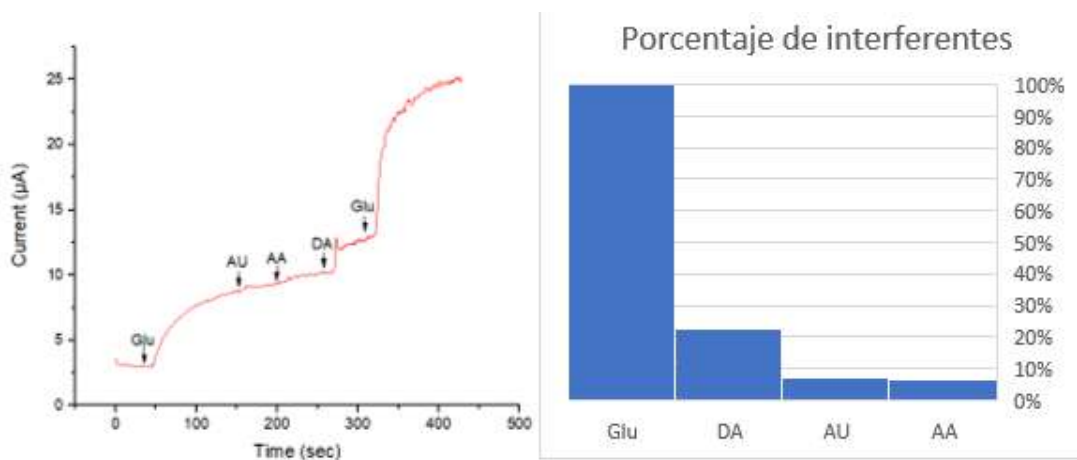


Figura 21 Amperometría a electrodo de MWCNT-FcMeOH (GOx) vs Ag/AgCl en PBS pH 5.6 a 360 mV. Adiciones de Glucosa con concentraciones para sangre (5 mM), AU (0.2 mM), AA (0.01 mM), DA (0.05 mM) y Glucosa (5mM). b) Gráfica de porcentaje de interferentes.

En cuanto a las pruebas de interferentes para sudor se obtuvieron los resultados presentados en la Figura 21, en este estudio se puede observar que al adicionar Au y AA se tiene un incremento en la corriente de 6.8% y 6.7% respectivamente, cuando se adiciona DA se tiene un aumento de corriente del 22% sin embargo es un aumento muy bajo comparado con el incremento al adicionar glucosa.

6.5 Diseño y evaluación del sensor tipo parche

Para evaluar el sensor en un parche se fabricaron los electrodos de trabajo y referencia. Para el electrodo de trabajo se utilizó únicamente una tira de papel Toray con dimensiones 0.3 x 3 cm. Para el electrodo de referencia se manufacturo un electrodo de Ag/AgCl (Choi, Li, Cutting, & Searson, 2017), para esto se depositó sobre un electrodo de papel Toray 5 μ L de una tinta de nanopartículas de plata y se dejó secar por 24 horas, posteriormente se enjuago con agua desionizada, se colocó una solución de FeCl₃ sobre la tinta y se dejó secar por 24 horas más. Una vez transcurrido el tiempo se enjuagó nuevamente con agua desionizada para eliminar el excedente y se colocaron 10 μ l de agar cubierto por una capa de resina epóxica, finalmente se deja secar y se compara el potencial con un electrodo de referencia para verificar que la diferencia de voltaje sea mínima.



Figura 22 Electrodo de referencia de Ag/AgCl para biosensor de glucosa tipo parche

Con este electrodo de referencia se realizaron dos diseños de parche distintos, el primero con un puente salino haciendo un pequeño agujero el cual sirve como canal de comunicación con los otros dos electrodos los cuales se colocan en ambos extremos como se muestra en la Figura 23 b). También se realizó un diseño de biosensor de glucosa sin puente salino colocando el electrodo de trabajo y el contra electrodo a los costados del electrodo de referencia Figura 23 a) tomando la precaución de no colocarlos sobre la resina epóxica. A los

tres electrodos en ambos diseños se les colocó una extensión de papel aluminio para poder conectarlos al potenciostato.

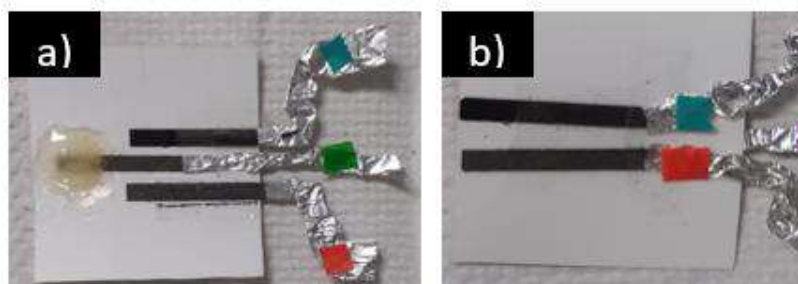


Figura 23 Biosensor de glucosa tipo parche. a) Biosensor con electrodo de referencia Ag/AgCl con cubierta de resina epóxica. b) Biosensor con electrodo de referencia Ag/AgCl con diseño de puente salino

En ambos diseños se realizaron pruebas electroquímicas para ver el comportamiento del biosensor al adicionar 1 mM de glucosa como se muestra en la Figura 24. Con las amperometrías estáticas realizadas a ambos diseños podemos observar que el diseño a) realizado sin puente salino presenta un mínimo incremento en la corriente al adicionar glucosa, sin embargo, con el diseño b) con puente salino, se puede apreciar como en las primeras adiciones de glucosa la corriente no se estabiliza y no presenta un gran aumento, a partir de 3 mM se puede observar una corriente más estable con un ligero aumento sin embargo no cumple con las características necesarias para ser utilizado en un biosensor. En ambas pruebas amperométricas tenemos poca estabilidad de la señal de corriente y esto podemos atribuirlo al uso del papel aluminio que introduce ruido a la señal y representa una considerable pérdida en la corriente.

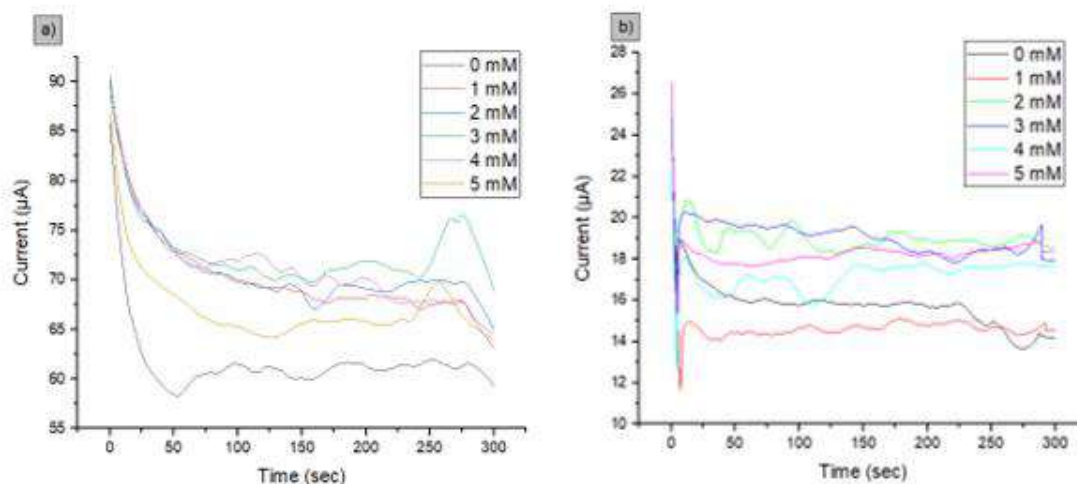


Figura 24 Amperometrías estáticas al biosensor de glucosa con adiciones de 1 mM de glucosa. a) Sin puente salino, b) con puente salino.

Se realizó un nuevo diseño de parche Figura 25, el electrodo de referencia se usó únicamente con nanopartículas de plata y FeCl_3 , el electrodo de trabajo y el contraelectrodo se colocaron en los extremos del electrodo de referencia, se optó por no usar la extensión de papel aluminio y conectar el parche directamente al potenciostato para evitar introducir ruido a la señal. El biosensor se evaluó en una media celda con PBS de pH 5.6 y adiciones de glucosa 1 mM.

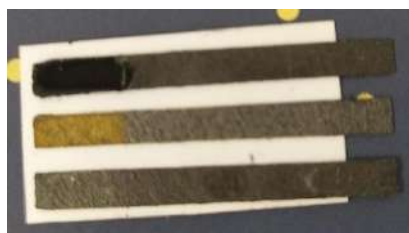


Figura 25 Diseño de parche para biosensor de glucosa

Se realizaron amperometrías estáticas con adiciones de 1 mM de glucosa, en el amperograma Figura 26 se puede observar como la corriente es mucho más estable en comparación con el parche anterior, también presenta un mayor aumento de corriente entre cada una de las adiciones siendo este en promedio de $0.8 \mu\text{A}$ lo que es congruente con el aumento que se tiene cuando se usan electrodos comerciales

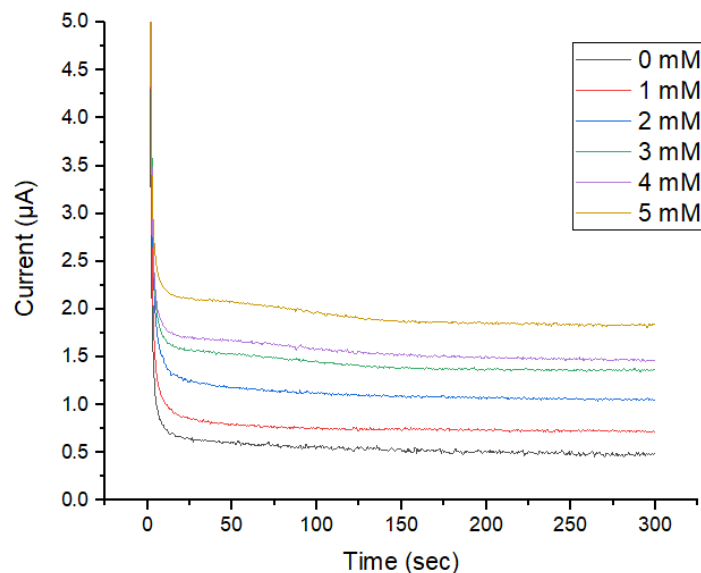


Figura 26 Amperometría estática a electrodo de GOx/MWCNT/ FcMeOH /GA vs Ag/AgCl en PBS pH 5.6 a 360 μ A con adiciones de 1 mM de glucosa.

A pesar de que la respuesta del diseño anterior es buena, se optó por buscar un soporte para los electrodos que pudiera ayudar a sujetar el biosensor en la piel para esto se utilizó como base un parche de Tegaderm sobre el cual se colocó el sistema de tres electrodos como se ve en la Figura 27. Para realizar las pruebas electroquímicas en este diseño se conectaron cada uno de los electrodos al potenciostato y sobre la superficie izquierda de los electrodos (que es donde está colocado el depósito de la enzima) se colocaron 20 μ L de PBS pH 5.6 con diferentes concentraciones de glucosa en un rango de 0 a 5 mM, para cada una de las concentraciones se realizaron voltamperometrías cíclicas y cronoamperometrías.



Figura 27 Diseño de parche para un biosensor de glucosa usando como base Tegaderm

En la figura 28 se presenta el cronoamperograma obtenido por este parche, como se puede observar presenta una buena estabilidad en la corriente, además de incrementos aproximados de 0.5 μ A por cada adición de glucosa. El comportamiento de este parche es similar al

anterior pues en ambos las corrientes se encuentran en un rango entre $0.5 \mu\text{A}$ – $2.8 \mu\text{A}$, lo que indica que parche dérmico no causa interferencia en la reacción electroquímica ni en la corriente obtenida. Se decidió utilizar este parche pues el que se adapta mejor a los objetivos de este proyecto.

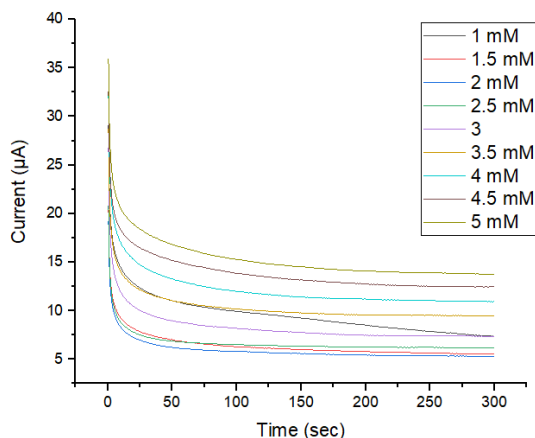


Figura 28 Amperometría estática a electrodo de $\text{GOx/MWCNT/FcMeOH/GA}$ vs Ag/AgCl en PBS pH 5.6 a $360 \mu\text{A}$ con adiciones de 1 mM de glucosa.

6.6 Pruebas con el dispositivo electrónico tipo parche

Se analizó el sudor de tres personas distintas y se compararon los resultados obtenidos, como se observa en las gráficas, lo que se quería lograr con dicha comparación era saber cuál de los sudores tiene mayor concentración de glucosa en la figura 29 se observa que el sudor con mayor corriente y por ende mayor concentración de glucosa es el de Arturo (sujeto de prueba), sin embargo, en la gráfica 30 el sudor que tiene mayor corriente es el de Richie. En

ambas pruebas se utilizaron los mismos sudores por lo que se esperaba que diera los mismos resultados.

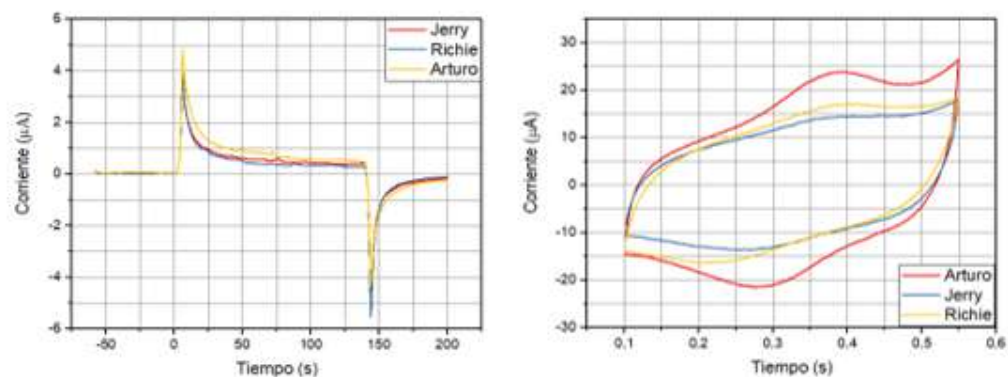


Figura 29 Cronoamperometría y voltamperometría cíclica de sudor con biosensor en parche prueba 1

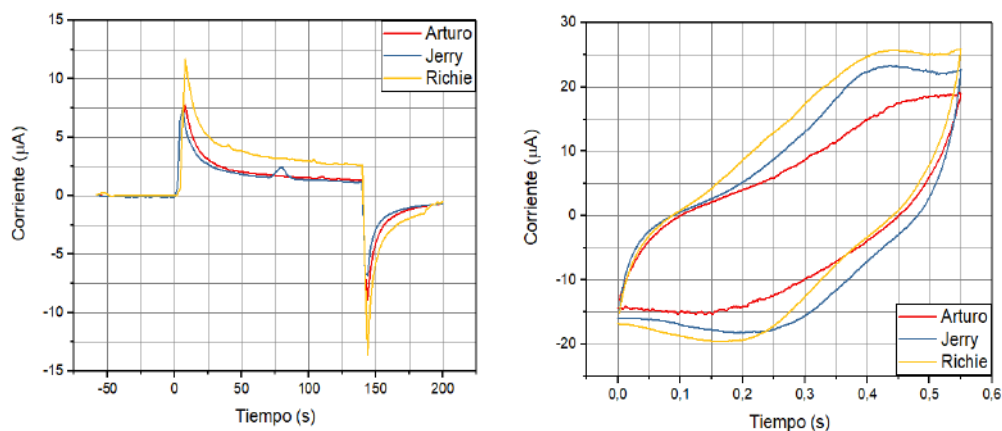


Figura 30 Cronoamperometría y voltamperometría cíclica de sudor con biosensor en parche prueba 2

Para conocer el valor exacto de glucosa que se tiene optamos primero por elegir un solo sudor, que en este caso fue el Jerry, preparamos diferentes alícuotas en concentraciones de 0.5 mM en 0.5 mM en un rango de 0 mM a 5 mM, probamos cada una de ellas en el parche y los valores de corriente no eran congruentes, incluso observamos que el sudor se veía de distinto color y un poco más denso que el primer sudor obtenido, esto puede deberse a la dieta de Jerry e incluso al shampoo, cremas y gel que usa comúnmente. Para tener mediciones más confiables se decidió hacer alícuotas de la misma manera, pero en lugar de usar sudor usamos PBS pH 5.6 de esta manera logramos obtener cronoamperometrías con aumentos de corriente congruentes con la cantidad de glucosa que se estaba adicionando y se obtuvo la curva de calibración para el sensor.

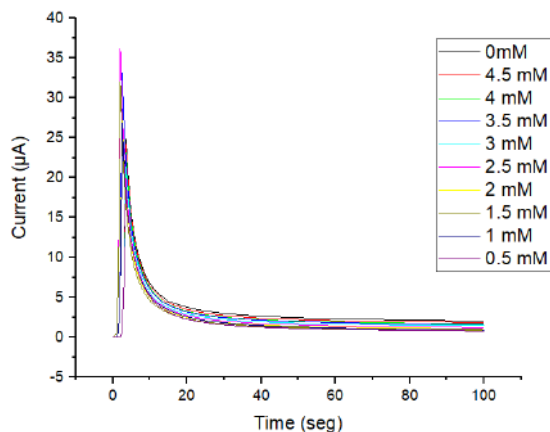


Figura 31 Amperometría estática en parche con PBS pH 5.6 a 360 µA con adiciones de 0.5 mM de glucosa.

Se conectó el parche al circuito electrónico, se colocaron 40 µL de diferentes concentraciones de glucosa en PBS pH 5.6 y se ejecutaron las pruebas desde la aplicación BT del teléfono. El programa primero activa la celda para empezar a medir el circuito abierto, es decir el voltaje existente en la media celda, para esto se programó que tomara 10 muestras, en cada una se almacena el valor de voltaje y finalmente se calculó un promedio para obtener el valor de circuito abierto, dicho valor se almacenó en una variable, posteriormente se realiza una voltamperometría cíclica para esto se programa un rango en el que se desea trabajar, en este caso se busca tener una ventana de potencial entre -100 a 400 mV, el programa ejecuta un barrido de potencial a partir del circuito abierto hasta llegar a 400 mV, durante el barrido compara el voltaje obtenido en cada escalón y almacena el valor más grande, de esta manera se obtiene el pico de potencial donde ocurre la oxidación y este valor se almacena en una variable.

Lo siguiente es realizar una cronoamperometría, para esto el programa toma el voltaje del pico de oxidación obtenido durante la voltamperometría cíclica y aplica este voltaje durante 5 min. Durante este tiempo el programa almacena el valor de corriente que tiene la media celda, finalmente este valor de corriente se sustituye en la ecuación obtenida de la curva de calibración para calcular el valor de glucosa en unidades milimolares que se tiene en la muestra. Finalmente, este valor de glucosa se envía por medio del módulo de BT a la aplicación previamente desarrollada en app inventor y se imprime en la pantalla del teléfono inteligente en unidades de mg/dl las cuales son las medidas clínicamente utilizadas para la cuantificación de glucosa.

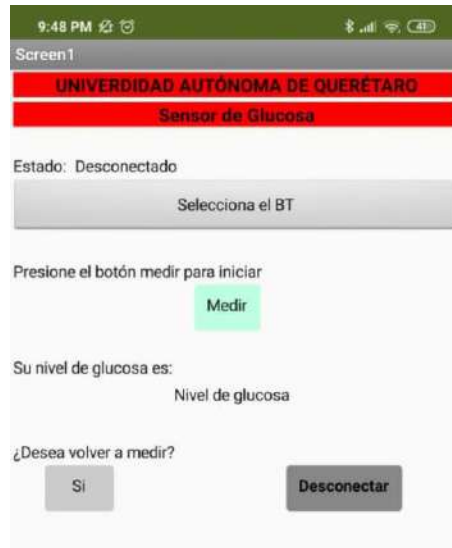


Figura 32 Interfaz para aplicación en teléfono inteligente

Conclusiones

A lo largo de este proyecto se probaron 8 diferentes métodos de atrapamiento de la enzima glucosa oxidasa, se demostró que si bien todos los métodos lograron hacer el cross-linking y detectar glucosa el método que incluye GOx/MWCNT/GA/FcMeOH es el que cumple con las características necesarias para el fin que tiene este trabajo. Dicho método se optimizó para obtener aumentos de corriente aún mayores lo que se busca para poder adaptarse a la electrónica.

Para poder realizar el biosensor dérmico no invasivo y flexible se diseñó un parche el cual contiene la media celda, es decir se colocó el electrodo de trabajo con el método de atrapamiento optimizado, se fabricaron electrodos de Ag/AgCl y Fe₂O₃ los cuales se colocaron como electrodos de referencia y se usó papel toray como contraelectrodo. Se desarrolló un circuito electrónico y se programó para que funcionara como un potenciómetro para que pudiera realizar las pruebas electroquímicas además de comunicarse con BT a la aplicación que también se desarrolló para poder ejecutar las mediciones que el parche necesitara.

Finalmente se construyó todo el biosensor y se hicieron pruebas en sudor las cuales nos indican que el biosensor está funcionando de una manera correcta sin embargo aún existen interferentes que afectan en las mediciones, se hicieron pruebas con PBS pH 5.6 y concentraciones conocidas de glucosa las cuales funcionaron de manera exitosa.

Este proyecto cumplió con los alcances esperados pues se tiene un biosensor inalámbrico y flexible capaz de cuantificar glucosa, además de ser innovador al contar con su propia aplicación para ejecutar las pruebas, mostrar y almacenar datos.

Perspectivas del proyecto

Como ya se ha comentado los biosensores tienen grandes expectativas y alcances para su comercialización como parte de aplicaciones médicas en un mediano plazo. El paso siguiente en este proyecto es realizar la miniaturización del sistema electrónico para que pueda ser llevado fácilmente por el paciente, para esto se propone buscar componentes eléctricos con dimensiones más pequeñas pero que sigan teniendo las mismas características. Es importante

también proponer un diseño final donde este integrado el circuito electrónico y el parche el cual pueda estar soportado cerca de la piel para poder captar el sudor.

Puede proponerse también probar otros métodos de atrapamiento de la enzima glucosa oxidasa buscando aumentar aún más las corrientes obtenidas, además de agregar una membrana sobre los electrodos para que estos no estén en contacto directo con la piel y con su tamaño de poro puedan filtrar algunos de los componentes que interfieren con las pruebas como cremas, suciedad, células muertas, etc.

Finalmente, para darle un uso médico será necesario calibrar el biosensor por lo que se necesitará estudiar una población de pacientes con glucosa y monitorear su nivel de glucosa en sangre y en el sudor para obtener resultados confiables. Con los datos obtenidos de este estudio se podrá hacer un análisis y calibrar el biosensor.

Como perspectiva final se propone el desarrollo de un biosensor portátil de glucosa para uso médico

Bibliografía

- Abellán Llobregat, A. (2017). Development of electrochemical sensors based on nanostructured carbon materials for health-care applications.
- Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S., & Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase— an overview. *Biotechnology Advances*, 27(4), 489–501.
- Blanco-López, M. C., Lobo-Castañón, M. J., & Fernández Abedul, M. T. (2020). Chapter 17 - Bionzymatic amperometric glucose biosensor. In M. T. B. T.-L. M. in D. E. Fernandez Abedul (Ed.) (pp. 173–181). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815932-3.00017-6>
- Bollella, P., Gorton, L., & Antiochia, R. (2018). Direct Electron Transfer of Dehydrogenases for Development of 3rd Generation Biosensors and Enzymatic Fuel Cells. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 18(5), 1319. <https://doi.org/10.3390/s18051319>
- 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*, 250, 673–678. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.04.129>
- Christwardana, M. (2017). Combination of physico-chemical entrapment and crosslinking of low activity laccase-based biocathode on carboxylated carbon nanotube for increasing biofuel cell performance. *Enzyme and Microbial Technology*, 106, 1–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.06.012>
- Carrazón, J. M. P., & García, A. J. R. (2000). Biosensores electroquímicos: una herramienta útil para el análisis medioambiental, alimentario y clínico. *Anales de La Real Sociedad Española de Química*, 2, 5–15.
- CEVECE. (2013). Reporte Diabetes Mellitus. *Gobierno Del Estado de México*, 43. http://salud.edomexico.gob.mx/cevece/documentos/documentostec/reportes/Diabetes_mellitus.pdf
- Classification, I. (2014). Standards of medical care in diabetes-2014. *Diabetes Care*, 37(SUPPL.1), 14–80. <https://doi.org/10.2337/dc14-S014>
- De La Torre Fraga, J. C., & Mesa Álvarez, L. (2016). Sweat physiology. *Piel*, 31(5), 350–359. <https://doi.org/10.1016/j.piel.2015.10.009>
- Díaz-González, J. M., Escalona-Villalpando, R. A., Arriaga, L. G., Minter, S. D., & Casanova-Moreno, J. R. (2020). Effects of the cross-linker on the performance and stability of enzymatic electrocatalytic films of glucose oxidase and dimethylferrocene-modified linear poly(ethyleneimine). *Electrochimica Acta*, 337, 135782. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.135782>
- Dutta, A. K., Maji, S. K., Biswas, P., & Adhikary, B. (2013). New peroxidase-substrate 3,5-di-tert-butylcatechol for colorimetric determination of blood glucose in presence of Prussian Blue-modified iron oxide nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 177, 676–683. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.11.074>

- Escalona-Villalpando, R. A., Ortiz-Ortega, E., Bocanegra-Ugalde, J. P., Minter, S. D., Ledesma-García, J., & Arriaga, L. G. (2019). Clean energy from human sweat using an enzymatic patch. *Journal of Power Sources*, 412(August 2018), 496–504. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2018.11.076>
- Escalona-Villalpando, R.A., Martínez-Maciel, A. C., Espinosa-Ángeles, J. C., Ortiz-Ortega, E., Arjona, N., Arriaga, L. G., & Ledesma-García, J. (2018). Evaluation of hybrid and enzymatic nanofluidic fuel cells using 3D carbon structures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(26). <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.04.016>
- Escalona-Villalpando, R.A., Reid, R. C., Milton, R. D., Arriaga, L. G., Minter, S. D., & Ledesma-García, J. (2017). Improving the performance of lactate/oxygen biofuel cells using a microfluidic design. *Journal of Power Sources*, 342. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2016.12.082>
- Escalona-Villalpando, R A, Dector, A., Dector, D., Moreno-Zuria, A., Durón-Torres, S. M., Galván-Valencia, M., ... Ledesma-García, J. (2016). Glucose microfluidic fuel cell using air as oxidant. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(48), 23394–23400. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.04.238>
- Escalona-Villalpando, Ricardo A, Hasan, K., Milton, R. D., Moreno-Zuria, A., Arriaga, L. G., Minter, S. D., & Ledesma-García, J. (2019). Performance comparison of different configurations of Glucose/O₂ microfluidic biofuel cell stack. *Journal of Power Sources*, 414, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2018.12.079>
- Galant, A. L., Kaufman, R. C., & Wilson, J. D. (2015). Glucose: Detection and analysis. *Food Chemistry*, 188(April), 149–160. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.071>
- Gracia, R., & Mecerreyes, D. (2013). Polymers with redox properties: materials for batteries, biosensors and more. *Polymer Chemistry*, 4(7), 2206–2214. <https://doi.org/10.1039/C3PY21118E>
- Gregorio-Jáuregui, K. M., Rivera-Salinas, J. E., Saade-Caballero, H., López-Campos, R. G., Martínez-Hernández, J. L., & Ilina, A. (2012). Las nanopartículas magnéticas y sus múltiples aplicaciones, 397–411.
- Gubin, S. P. (2009). *Magnetic nanoparticles*. John Wiley & Sons.
- Heller, A., & Feldman, B. (2008). Electrochemical Glucose Sensors and Their Applications in Diabetes Management. *Chemical Reviews*, 108(7), 2482–2505. <https://doi.org/10.1021/cr068069y>
- Hernández, M., Galán, C. A., Álvarez, G. A., & Pérez, M. E. (2011). Desarrollo de un Biosensor Amperométrico en Configuración plana para la Cuantificación de Colesterol. *Información Tecnológica*, 22, 25–32. https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642011000600004&nrm=iso
- Harvey, C. J., LeBouf, R. F., & Stefaniak, A. B. (2010). Formulation and stability of a novel artificial human sweat under conditions of storage and use. *Toxicology in Vitro*, 24(6), 1790–1796. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.06.016>
- Hickey DP, Reid RC, Milton RD, M. S. (2016). A self-powered amperometric lactate biosensor based on lactate oxidase immobilized in dimethyl ferrocene-modified LPEI. *Biosens. Bioelectron.*, 15, 26–31.

- Jiménez, C. C., & León, D. E. P. (2009). Biosensors: Implementation and outlook in the control and process quality and foodstuffs. *Vitae*, *16*(1), 144–154.
- Kim, J., Campbell, A. S., & Wang, J. (2018). Wearable non-invasive epidermal glucose sensors: A review. *Talanta*, *177*, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.077>
- López, M. S.-P. (1959). *Biosensores Amperométricos De Tirosinasa Para La Determinación De Compuestos Fenólicos En Medios Acuoso Y No Acuoso*. Universidad Complutense De Madrid (Vol. 109).
- Leskovac, V., Trivić, S., Wohlfahrt, G., Kandrač, J., & Peričin, D. (2005). Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *37*(4), 731–750.
- Mello, L. D., & Kubota, L. T. (2002). Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*, *77*(2), 237–256.
- Mendoza Madrigal, A. G. (2013). Biosensores Mecanicos en el Area Biologica y Alimentaria. *Revista Mexicana de Ingenieria Quimica*, *12*.
- Prodromidis, M. I., & Karayannis, M. I. (2002). Enzyme Based Amperometric Biosensors for Food Analysis. *Electroanalysis*, *14*(4), 241–261. [https://doi.org/10.1002/1521-4109\(200202\)14:4<241::AID-ELAN241>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1521-4109(200202)14:4<241::AID-ELAN241>3.0.CO;2-P)
- Olarte, O., Chilo, J., Pelegri-Sebastia, J., Barbe, K., & Van Moer, W. (2013). Glucose detection in human sweat using an electronic nose. *Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS*, 1462–1465. <https://doi.org/10.1109/EMBC.2013.6609787>
- Retama, B. J. R. (2005). *Síntesis y caracterización de nuevas micropartículas poliméricas y su aplicación como sistemas de inmovilización enzimática en el diseño de biosensores amperométricos*. Universidad Complutense de Madrid.
- Saleem, M., Yu, H., Wang, L., Zain-ul-Abdin, Khalid, H., Akram, M., ... Huang, J. (2015). Review on synthesis of ferrocene-based redox polymers and derivatives and their application in glucose sensing. *Analytica Chimica Acta*, *876*, 9–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.012>
- Tohill, I. E. (2001). Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector. *Computers and Electronics in Agriculture*, *30*(1–3), 205–218.
- Thangamuthu, R., Pan, Y.-C., & Chen, S.-M. (2011). Electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide and its determination in antiseptic and soft-glass cleaning solutions at phosphotungstate-doped-glutaraldehyde-cross-linked poly-l-lysine film electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *151*(2), 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.08.028>
- Valdés-Ramírez, G., Li, Y.-C., Kim, J., Jia, W., Bandodkar, A. J., Nuñez-Flores, R., ... Wang, J. (2014). Microneedle-based self-powered glucose sensor. *Electrochemistry Communications*, *47*, 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2014.07.014>

- Wang, J. (1999). Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 19(1–2), 47–53.
- Werchmeister, R. M. L., Tang, J., Xiao, X., Wollenberger, U., Hjuler, H. A., Ulstrup, J., & Zhang, J. (2019). Three-Dimensional Bioelectrodes Utilizing Graphene Based Bioink. *Journal of The Electrochemical Society*, 166(16), G170–G177. <https://doi.org/10.1149/2.0261916jes>
- Wooster, W. A. (1972). *Crystal structure*. *Nature* (Vol. 236). <https://doi.org/10.1038/236285b0>