

Universidad Autónoma de Querétaro



Facultad de ingeniería

Desarrollo de electrodos para un biosensor/biocelda de combustible de lactato

**Tesis individual para obtener el grado de:
Ingeniero en Nanotecnología**

Presenta:

Erick Salinas Ávila

Director de tesis:

Ricardo Antonio Escalona Villalpando

Co-directora de tesis:

Janet Ledesma García

Santiago de Querétaro, Querétaro.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería



Desarrollo de electrodos para un biosensor/biocelda de combustible de lactato

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Ingeniero en Nanotecnología

Presenta:

Erick Salinas Ávila

Dirigido por:

Dr. Ricardo Antonio Escalona Villalpando

Codirector:

Dra. Janet Ledesma García

SINODALES

Dr. Ricardo Antonio Escalona Villalpando

Presidente

Dra. Janet Ledesma García

Secretario

Dr. Luis Gerardo Arriaga Hurtado

Vocal

Dra. Alejandra Álvarez López

Suplente

Ricardo Antonio Escalona V.

Firma

Firma

Firma

Alejandra A.L.

Firma

Centro Universitario
Querétaro, QRO.
México
Marzo 2022

A mis padres:

Sandra Ávila Rivera y Ernesto Salinas García.

*“Un viaje muy largo
se inicia con un sólo paso”*

Agradecimientos.

Al Laboratorio Nacional de Micro y Nano Flúídica (LabMyN) por permitirme desarrollar este trabajo y esta parte de mi desarrollo profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por su apoyo a través del proyecto "Generación de Bioenergía Corporal y su Aprovechamiento en Biosensores Autónomos: Sudor Humano" - 845132 aprobado en la convocatoria de Ciencia de Frontera 2019.

Al Dr. Ricardo Escalona por darme la oportunidad de ser parte de uno de sus proyectos, por sus enseñanzas y consejos, su paciencia y sobre todo su gran humanidad dentro y fuera del ámbito académico. A la Dra. Janet y el Dr. Gerardo por su apoyo y por hacernos sentir parte de este grupo de investigación.

A mis padres por todo su apoyo durante todos estos años, por creer en mí y luchar por que yo pueda cumplir mis sueños, sé que no ha sido fácil, pero gracias por darme todo lo que tengo en la vida y siempre guiarme con su gran ejemplo. Gracias en general a toda mi familia por darme los valores que me conforman el día de hoy y todas sus enseñanzas que me seguirán conformando siempre.

Gracias a mis amigos y compañeros de laboratorio, Arruan y Ari por compartir su conocimiento y alegría. A mis grandes amigos Bryan, Alexis y Martín por tanto apoyo y por todos los momentos compartidos. A toda "la vándera" por ser mis amigos, ¡muchas gracias!, les debo un agradecimiento y un fuerte abrazo a cada uno.

A mis compañeros de generación por hacer esta experiencia más interesante.

1 Índice de contenido

2	Resumen.....	10
3	Abstract.....	12
4	Introducción.....	14
4.1	Antecedentes.....	16
4.1.1	Biosensores.....	16
4.1.2	Bioceldas de combustible.....	19
4.1.2.1	Funcionamiento de una biocelda de combustible.....	20
4.1.2.2	Bioceldas enzimáticas.....	22
4.1.3	Métodos electroquímicos.....	23
4.1.3.1	Voltamperometría cíclica.....	23
4.1.3.2	Cronoamperometría.....	26
4.1.3.3	Voltametría de pulso.....	27
4.1.4	Métodos de inmovilización enzimática.....	28
4.1.4.1	Método de inmovilización de LOx con $K_3Fe[CN_6]$	29
4.1.4.2	Método de inmovilización de LOx con Azul de Prusia.....	29
4.1.5	Compuestos análogos al azul de Prusia.....	30
4.2	Justificación.....	30
4.3	Hipótesis.....	32
4.4	Objetivos.....	32
4.4.1	Objetivo general.....	32
4.4.2	Objetivos específicos.....	32
5	Materiales y métodos.....	33
5.1	Reactivos.....	33
5.2	Síntesis de partículas de Azul de Prusia.....	33

5.3	Síntesis de partículas de CuFe-PBA	33
5.4	Preparación de electrodos de $K_3Fe[CN_6]/LOx/Agar$	33
5.5	Preparación de electrodos de nanopartículas de Fe_2O_3	34
5.6	Preparación de electrodos de Azul de Prusia/ $LOx/EGDGE$	34
5.7	Preparación de electrodos de CuFe PBA	34
5.8	Evaluación de los electrodos por métodos electroquímicos.....	34
5.9	Evaluación de los electrodos de LOx para una biocelda de combustible de lactato 35	
6	Resultados y discusión	36
6.1	Evaluación de electrodos de $K_3Fe[CN_6]/LOx/Agar$	36
6.2	Electro oxidación de lactato a altos voltajes con de Fe_2O_3 NP's.....	42
6.3	Evaluación de electrodos de Azul de Prusia/ $LOx/EGDGE$	46
6.4	Evaluación de electrodos de Cu-Fe PBA	57
6.5	Comparación de resultados	66
6.6	Desarrollo de la biocelda de combustible	68
7	Conclusiones.....	69
8	Perspectivas	71
9	Referencias	71
10	Anexos	75

Índice de Figuras

Figura 4.1 Reacciones electroquímicas involucradas en biosensores de LOx.	15
Figura 4.2 a) Elementos estructurales de un biosensor, b) principio de funcionamiento del proceso de biodetección (Mendoza-Madrigal et al., 2013).	16
Figura 4.3 Funcionamiento de un mediador electroquímico (DECTOR, 2016).	19
Figura 4.4 Grafico característico de una curva de descarga (DECTOR, 2016).	22
Figura 4.5 a) Representación de una porción de la superficie tridimensional i-t-E. b) Barrido de potencial a través de esta superficie. (“Allen J. Bard and Larry R. 2002).....	24
Figura 4.6 Barrido de potencial típico de una voltamperometría (JIMÉNEZ C et al., 2009).	25
Figura 4.7 Voltamperometría resultante (“Allen J. Bard and Larry R. Faulkner, Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, New York: Wiley, 2001, 2nd Ed.,” 2002).	25
Figura 4.8 Experimento de paso de potencial para un electrodo plano: (a) forma de onda potencial, (b) respuesta de corriente.	27
Figura 4.9 Grafica representativa de DPV y SWV	28
Figura 4.10 (a) La estructura de $\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ en tres sistemas de coordenadas (b) y plano bc (Jiao et al., 2017).	30
Figura 5.1 Acomodo de electrodos usado para la realización de pruebas electroquímicas.	35
Figura 6.1 Voltamperometrías cíclicas de $\text{K}_3\text{Fe}[\text{CN}_6]/\text{LOx}/\text{Agar}$ método A a diferentes concentraciones de lactato en PBS pH 7.4 (0.1 M) a una velocidad de barrido de $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$	37
Figura 6.2 Triplicado de voltamperometrias cíclicas a 300 mV con electrodos de $\text{K}_3\text{Fe}[\text{CN}_6]/\text{LOx}/\text{Aga}$	39
Figura 6.3 Grafica y obtención de ordenada al origen y pendiente de la ecuación de Lineweaver-Burk a partir de los datos experimentales.	40
Figura 6.4 Voltamperometrías cíclicas de $\text{K}_3\text{Fe}[\text{CN}_6]/\text{LOx}/\text{Agar}$ método B a diferentes concentraciones de lactato en PBS pH 7.4 (0.1 M) a una velocidad de barrido de $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$	42
Figura 6.5. Voltamperometrías cíclicas de nanopartículas de Fe_3O_2 a diferentes concentraciones de H_2O_2 en PBS pH 5.6 (0.1 M) a una velocidad de barrido de $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.	

b) Dependencia de la corriente con la concentración de H_2O_2 en un potencial de oxidación de 1.5 V en la voltamperometría cíclica (a).	44
Figura 6.6 a) Voltamperometrías cíclicas de nanopartículas de Fe_2O_3 a diferentes concentraciones de lactato en PBS pH 5.6 (0.1 M) a una velocidad de barrido de $10\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.	
b) Dependencia de la corriente con la concentración de lactato en un potencial de oxidación de 1.5 V en la voltamperometría cíclica (a).	45
Figura 6.7. Amperometrías de electrodos con Fe_2O_3 y Fe_2O_3 -ZnO con adiciones de lactato y peróxido de hidrogeno.....	46
Figura 6.8. a) Voltamperometrías cíclicas de nanopartículas de PB a diferentes concentraciones de H_2O_2 en PBS pH 5.6 (0.1 M) a una velocidad de barrido de $10\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.	
b) Imagen ampliada del pico de oxidación de a) en un rango de 0.42 V a 0.62 V.....	47
Figura 6.9. Voltamperometrías cíclicas de partículas de PB y LOx a diferentes concentraciones de Lactato en PBS pH 5.6 (0.1 M) a una velocidad de barrido de $10\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.	
.....	49
Figura 6.10 Triplicado de voltamperometrias cíclicas a 200 mV con electrodos de PB /LOx/EGDGE en PBS pH 5.6 (0.1 M) a una velocidad de barrido de $10\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.	50
Figura 6.11 Gráfica y obtención de ordenada al origen y pendiente de la ecuación de Lineweaver-Burk aparente a partir de los datos experimentales.	51
Figura 6.12 Cronoamperometrías de electrodos PB/ LOx en buffer PBS pH 5.6, a diferentes concentraciones de Lactato en PBS pH 5.6 (0.1 M) en agitación continua.	52
Figura 6.13 Duplicado de amperometrías de electrodos con PB y LOx.....	53
Figura 6.14. Prueba de interferentes de PB mediante cronoamperometría en PBS pH 7.4 (0.1 M) a un potencial de -300 mV.....	54
Figura 6.15 Microscopía electrónica de barrido de PB.....	55
Figura 6.16 XRD de PB sintetizado.....	56
Figura 6.17 Voltamperometrías cíclicas de nanopartículas de PB y LOx método B a diferentes concentraciones de Lactato en PBS pH 5.6 (0.1 M) a una velocidad de barrido de $10\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.	57
Figura 6.18 (a) La estructura de $Cu_3[Fe(CN)_6]_2$ en tres sistemas de coordenadas (b) y plano bc (Jiao et al., 2017).....	58

Figura 6.19 Voltamperometrías cíclicas de partículas de a) Cu-Fe PBA y b) Cu-Fe PBA y LOx a diferentes concentraciones de Lactato en PBS pH 5.6 (0.1 M) a una velocidad de barrido de $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$	59
Figura 6.20 Voltametría de pulso diferencial de CuFe-PBA a diferentes concentraciones de lactato en PBS pH 5.6 (0.1 M).....	60
Figura 6.21 a) Concentración de lactato vs diferencia de corriente obtenida de la Voltametría de pulso diferencial de CuFe-PBA con LOx a diferentes concentraciones de lactato en PBS pH 5.6 (0.1 M) b) Concentración de lactato vs diferencia de corriente obtenida de la Voltametría de pulso diferencial de CuFe-PBA con LOx a diferentes concentraciones de lactato on un rango de 0 a 8 mM.	61
Figura 6.22 a) Cronoamperometría de FeCu NP's a con adiciones de ácido láctico en PBS pH 7.4 (0.1 M) a un potencial de -300mV b) corriente en función de la concentración de lactato.	62
Figura 6.23 Efecto de la nitrogenación y oxidación en el electrodo de CuFe-PBA.	63
Figura 6.24 Prueba de interferentes de CuFe-PBA.....	64
Figura 6.25 Microscopía electrónica de barrido de CuFe-PBA.	65
Figura 6.26 XRD de CuFe-PBA sintetizado.	66
Figura 6.27 Curvas de descarga de celda de combustible y efecto de las concentraciones de lactato sobre el rendimiento de la celda con ánodo de Cu-Fe PBA y cátodo de Lacasa/MWCNT a distintas concentraciones de lactato en PBS pH 5.6, a una polarización de $2 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$	69

2 Resumen

El interés por la implementación de dispositivos que nos permitan sensor analitos biológicos en medios complejos ha crecido continuamente en los últimos años, tanto en el sector industrial como en el sector salud y en la investigación. La rápida determinación de las concentraciones de lactato in situ o in vivo es importante dentro de sus respectivos procesos. En este trabajo se desarrollaron y evaluaron electrodos enzimáticos y abióticos, con materiales derivados del ferricianuro, para la determinación de lactato en fluidos simulados. En el caso de los electrodos enzimáticos se utilizó la inmovilización de la enzima lactato oxidasa (LOx) para el desarrollo de un biosensor de primera y/o segunda generación.

La enzima fue inmovilizada por el método entrecruzamiento con Etilen glicerol diglicidil éter (EGDGE) para los electrodos enzimáticos desarrollados en este trabajo. En el caso del electrodo abiótico fue probado un material bimetálico de Fe y Cu denominado análogo del azul de Prusia (PBA) por su semejanza estructural en escala molecular con el azul de Prusia (PB). Los materiales utilizados para la evaluación se depositaron sobre electrodos de papel carbón Toray y se utilizaron como electrodos de trabajo, mientras que como electrodo de referencia se utilizó Ag/AgCl y como contra electrodo se utilizó un electrodo de grafito. El electrodo enzimático de $K_3[Fe(CN)_6]$ y LOx mostró, mediante voltamperometrías cíclicas (VC), el mejor rango lineal con una $R^2 = 0.996$ en un rango de 1 a 50 mM. Sin embargo, la desviación estándar observada es grande repercutiendo en el límite de cuantificación y el límite de detección, esto debido a la poca afinidad entre este material y el papel toray usado para la elaboración de los electrodos y un método inespecífico de inmovilización.

Los electrodos de azul de Prusia (PB) y LOx fueron evaluados por VC, las pruebas fueron efectuadas a un pH de 5.6 mostrando un rango lineal de 8 - 40 mM con una $R^2 = 0.958$. Los límites de detección y cuantificación fueron de 7.5 mM y 25.4 mM respectivamente. Los electrodos mostraron una sensibilidad de $2.05 \times 10^{-3} \text{ mM} \cdot \mu\text{A}$, una corriente máxima de 0.35 μA y una constante de Michaelis-Menten aparente de 2.51 mM. Los electrodos elaborados con este material siguen presentando pérdida del material al contacto con agua y las soluciones buffer, sin embargo, esta pérdida es más gradual que en el caso del ferricianuro

En el caso del material FeCu-PBA sin enzima, se evaluó por voltametrías de pulso diferencial (DPV) y por cronoamperometrías. Estas pruebas se realizaron a un pH de 5.6 observando una saturación cuando la concentración superaba los 8 mM, el rango de 0 a 8 mM de linealidad con una $R^2 = 0.956$, un límite de cuantificación de 5.23 mM un límite de detección de 1.57 mM y una constante de Michaelis-Menten aparente de 42.83 mM.. Estos mismos electrodos se evaluaron en un pH de 7.4 por cronoamperometría. Los estudios solo se hicieron en un rango de 0 a 6 mM ya que este es el rango de concentraciones que pueden estar presentes en fluidos biológicos con pH's neutros. Algunos parámetros obtenidos fueron rango lineal 0 a 6 mM ($R^2 = 0.983$), límite de cuantificación de 2.895 mM y límite de detección de 0.874 mM. Las pruebas de interferentes mostraron que puede ser sensible a distintas moléculas por lo que en el sensado podría mostrar interferencia y su aplicación podría enfocarse más en procesos avanzados de oxidación.

De la misma manera para los electrodos con FeCu-PBA se hicieron curvas de descarga para evaluar su desempeño como celdas de combustible, usando como ánodo los electrodos con FeCu-PBA, mientras que el biocátodo fue derivado de la enzima lacasa unida a nanotubos de carbono multipared sin modificación y modificados con antraceno o pireno-antraceno (R.A. Escalona-Villalpando et al., 2017), los experimentos se llevaron a cabo sin agitación en una solución de PBS 0.1 M con un pH 5.6 en un solo compartimento. Para determinar el funcionamiento de la biocelda se hicieron curvas de descarga lineales desde potencial a circuito abierto a cero V con un barrido de 10 mV·s. Los resultados de estas pruebas mostraron también dispersión en los datos para los distintos electrodos probados. Obteniendo así una potencia máxima de 43.3 μW o 481 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^2$ teniendo en cuenta que la superficie de nuestro electrodo es de 3 mm por 3 mm, lo cual puede considerarse una buena producción de energía en comparación con otros sistemas reportados en la literatura (R A Escalona-Villalpando et al., 2019).

3 Abstract

Interest in the implementation of devices that allow us to sense biological analytes in complex media has grown continuously in recent years, both in the industrial sector, in the health sector and in research, the rapid determination of lactate concentrations *in situ* or *in vivo* is important within their respective processes. In this work, enzymatic and abiotic electrodes were developed and evaluated, with materials derived from ferricyanide, for the possible determination of lactate in biological or complex fluids. In the case of the enzymatic electrodes, the immobilization of the enzyme lactate oxidase (LOx) was used for the development of either a first or second generation biosensor.

The enzyme was immobilized by crosslinking with Ethylene glycerol diglycidyl ether (EGDGE) for the two cases of enzymatic electrodes developed in this work. In the case of the abiotic electrode, a Fe and Cu bimetallic material called a Prussian blue analog (PBA) was tested for its structural similarity on a molecular scale. The materials used for detection were deposited on Toray paper electrodes and were used as working electrodes, while an Ag / AgCl electrode was used as a reference electrode and a graphite electrode was used as a counter electrode. The enzymatic electrode of $K_3[Fe(CN)_6]$ and LOx showed, the best linear range with an $R^2 = 0.996$ in a range of 1 to 50 mM by cyclic voltammetry (VC). However, the standard deviation observed is large causing the limit of quantification to reach 14.4 mM and the limit of detection was 4.5 mM, this due to the low affinity between this material and the toray paper used to make the electrodes.

The Prussian blue (PB) and LOx electrode was tested by VC, the tests were done at a pH of 5.6 showing a linear range of 8 - 40 mM with an $R^2 = 0.958$. The detection and quantification limits were 7.594 mM and 25.4 mM respectively. The electrode showed a sensitivity of $2.05 \times 10^{-3} \text{ mM} \cdot \mu\text{A}$, a maximum current of 0.35 μA and an apparent Michaelis-Menten constant of 2.51 mM. The electrodes made with this material continue to show material loss when in contact with water and buffer solutions; however this loss is more gradual than in the case of ferricyanide.

In the case of the FeCu-PBA material, no enzyme was placed, and it was tested both by differential pulse voltammetry DPV and by chronoamperometry at -300 mV. These tests

were carried out at a pH of 5.6 clearly observing a saturation when the concentration exceeded 8 mM, the range from 0 to 8 mM showed a linearity $R^2 = 0.956$, a quantification limit of 5.23 mM, a detection limit of 1.57 mM, a sensitivity of $2.25 \text{ mM} \cdot \mu\text{A}^{-1}$. These same electrodes were evaluated at a pH of 7.4 by chronoamperometry. From the beginning it was notable that the dynamic range exceeded 50 mM, however the studies were only made in a range of 0 to 6 mM since this is the range of concentrations that can be present in biological fluids with neutral pHs. Some parameters obtained were linear range 0 to 6 mM ($R^2 = 0.983$), quantification limit of 2.895 mM and detection limit of 0.874 mM. In this case a good affinity was observed between the material and the Toray paper. However, the interferences tests showed that it can be sensitive to different molecules, so in the sensing it could show interference and its application could focus more on advanced oxidation processes.

In the same way, for the electrodes with FeCu-PBA, discharge curves were made to evaluate their performance as fuel biocells, using the electrodes with FeCu-PBA as anode, while the biocathode was derived from the enzyme laccase linked to carbon nanotubes multiwall without modification and modified with anthracene or pyrene-anthracene (RA Escalona-Villalpando et al., 2017), the experiments were carried out without stirring in a 0.1 M PBS solution with a pH of 5.6 in a single compartment. To determine the operation of the biocell, linear discharge curves were made from potential to open circuit steel V with a sweep of $10 \text{ mV} \cdot \text{s}$. The results of these tests also showed dispersion in the data for the different electrodes tested. Thus obtaining a maximum power of $43.3 \mu\text{W}$ or $481 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^2$, taking into account that the surface of our electrode is 3 mm by 3 mm, which can be considered a good energy production compared to other systems reported in the literature (RA Escalona-Villalpando et al., 2019).

4 Introducción

En la actualidad, es cada vez más común el uso de dispositivos que permiten el sensado de distintas sustancias. Éstos tienen la finalidad de controlar procesos tanto industriales como fisiológicos, logrando así la creación de dispositivos médicos no implantables. Mismos que permiten tomar medidas rápidas sin la necesidad de métodos invasivos. Un ejemplo son los glucómetros utilizados comúnmente para medir la glucosa en el cuerpo de pacientes de diabetes. Estos dispositivos pueden tener distintos medios de alimentación, por lo general pilas de ion-litio (Zebda et al., 2011), que ofrecen un voltaje estable y satisfacen la demanda de corriente. Sin embargo, se buscan fuentes de alimentación que no tengan un gran impacto en el ambiente y no limiten el desempeño y tiempo de vida útil del dispositivo.

Un dispositivo médico que sea utilizado para medir las concentraciones presentes en sudor o sangre de alguna molécula, como glucosa, urea, lactato, etc. (Watabe et al., 2013) puede tener en el mismo fluido que será la muestra a analizar, una interesante fuente de energía limpia y que siempre estará disponible para su aprovechamiento. Este trabajo se enfoca en el estudio de lactato presente en la fisiología del ser humano, en sangre, saliva, lágrimas y sudor corporal, y se asocia a diferentes aspectos fisiológicos como el metabolismo aerobio y anaerobio, enfermedades hepáticas, diabetes e incluso cáncer.

Es de mucha importancia la cuantificación de este compuesto en diferentes áreas, tanto para deportistas como en el sector médico, e inclusive en la reproducción humana in vitro, en donde el lactato juega un papel importante en el desarrollo temprano del embrión. Por otro lado, el lactato ha despertado interés en el diseño de celdas de combustible debido a su disponibilidad en los fluidos biológicos y tiene una alta densidad de energía. La oxidación de lactato por una sola enzima (LDH) podría generar teóricamente arriba de 507 Wh/L a una concentración de 7.6 M. Mientras que la oxidación completa del lactato teóricamente podría generar hasta 3041 Wh/L. Por lo que el lactato es una interesante fuente de energía (R A Escalona-Villalpando et al., 2019).

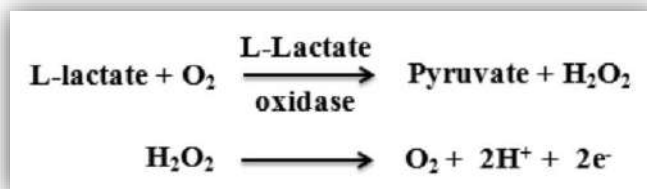


Figura 4.1 Reacciones electroquímicas involucradas en biosensores de LOx.

En este trabajo se evaluaron distintos mediadores electroquímicos junto con la enzima Lactato oxidasa (LOx), así como materiales que mostraron selectividad a la molécula de lactato sin la necesidad de enzima, destacándose en ambos casos la utilización de materiales derivados de ferricianuro.

Para ayudar al lector a tener una idea de la organización de la información a lo largo de este trabajo se dará una breve explicación de las secciones que se encuentran a continuación. El contenido de esta tesis comenzará describiendo los antecedentes teóricos de algunos de los puntos más importantes de esta investigación. Posteriormente se encuentra la justificación, hipótesis y objetivos de este trabajo,

Se describen las metodologías seguidas, las cuales se encuentran ordenadas según los objetivos específicos descritos, En la siguiente sección se presentan los resultados y sus discusiones, primero se encuentra la descripción de los resultados obtenidos de las evaluaciones electroquímicas para los electrodos enzimáticos de $\text{K}_3\text{Fe}[\text{CN}_6]/\text{LOx}/\text{Agar}$, a esto le sigue la evaluación de la electro-oxidación de lactato a altos voltajes con electrodos de nanopartículas de Fe_2O_3 , donde se demuestra que ocurre una electro oxidación de lactato en la superficie de los electrodos, y la relación con cada material depositado en la superficie del electrodo. Posteriormente la evaluación de electrodos con Azul de Prusia/ LOx/EGDGE donde se muestran los parámetros del sensor, y se hacen pruebas de XRD y TEM para obtener información cristalográfica y morfológica de las partículas sintetizadas. La evaluación de los electrodos de Cu-Fe PBA es la última parte de las evaluaciones presentadas en este trabajo, donde se pueden ver algunos de los parámetros de estos electrodos no enzimáticos, al igual que pruebas XRD y TEM así como estudios de interferentes y el efecto de la oxigenación y nitrogenación sobre su actividad. Por último

podemos encontrar la comparación de los resultados usando cada metodología y comparando con algunos sensores encontrados en la literatura, así como las conclusiones, perspectivas y referencias bibliográficas de este trabajo.

4.1 Antecedentes

4.1.1 Biosensores

Diferentes sectores como la industria de alimentos, bebidas y fármacos o los sectores dedicados a la salud o a la investigación y desarrollo, requieren de un método para cuantificar factores químicos o físicos dentro de sus procesos, con el objetivo de brindar mayor estabilidad y reproducibilidad a los mismos. Por lo tanto, estos sistemas deben ser capaces de aportar información confiable y en tiempo real. Es decir, existen una gran variedad de procesos que pueden ser controlables a partir de un número determinado de variables, desde grandes procesos industriales hasta alimentación o salud. Pero todos estos factores dependen de características individuales, factores físicos o químicos que ayudan a representar y entender un sistema. Por esto es importante conocer las distintas variables que influyen en él (Mendoza-Madrigal et al., 2013).

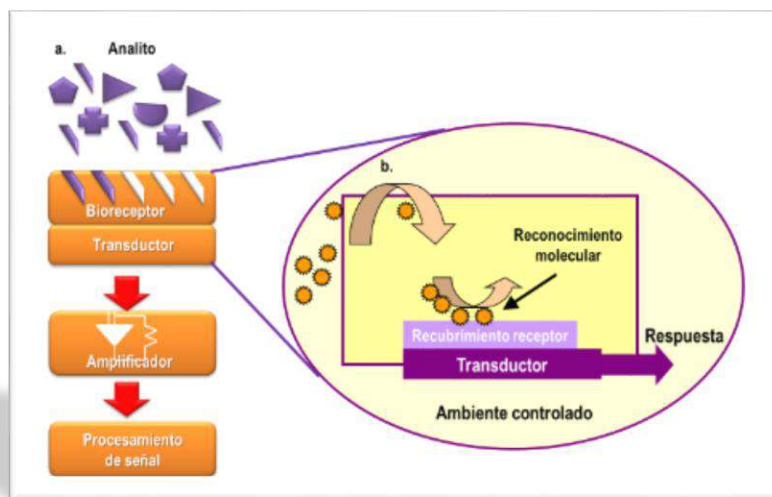


Figura 4.2 a) Elementos estructurales de un biosensor, b) principio de funcionamiento del proceso de biodetección (Mendoza-Madrigal et al., 2013).

Los biosensores son dispositivos de cuantificación analítica que, a diferencia de un sensor, comprenden un elemento de reconocimiento de conformación biológica, el cual está

asociado a un método de cuantificación que está descrito por el tipo de interacción que se dará entre el analito y nuestro elemento de detección, con el fin de obtener información de este en tiempo real. Existen diferentes elementos de detección biológicos como enzimas, anticuerpos, lectinas, receptores, células completas, ácidos nucleicos, aptámeros, etc. De forma general, se busca que exista una relación directa entre la concentración del analito y la corriente eléctrica o voltaje medido. Esta señal puede ser amplificada de manera conveniente con el objetivo de poder ser enviada a un dispositivo que haga la conversión correspondiente para que la señal pueda ser mostrada en las unidades de concentración del analito (JIMÉNEZ C & LEÓN P, 2009).

Se pueden clasificar los biosensores por el tipo de receptor o bioreceptor que utiliza como elemento de reconocimiento, que a su vez es la parte más importante para su especificidad. El término bioreceptor se refiere al elemento de origen biológico que mediante distintos procesos químicos o físicos logra la unión específica con el analito que nos interesa. Estos bioreceptores pueden clasificarse en 6 tipos que son: ADN o primers, Enzimáticos, células, aptámeros, compuestos inmunológicos y compuestos biomiméticos (Velusamy et al., 2010).

Los bioreceptores enzimáticos se consideran los primeros elementos de reconocimiento utilizados con el fin de detectar analitos específicos en muestras complejas que puedan tener diferentes moléculas interferentes., como en el caso de detección de nutrientes en alimentos o contaminantes en el medio ambiente ya que nos permite detectar exclusivamente nuestro analito de interés sin tener interferencia con todos los demás elementos presentes en la muestra. Sin embargo hay que tener en cuenta las condiciones de trabajo de estos sensores ya que al ser elementos de reconocimiento biológico tendrán ciertos parámetros como el pH o la temperatura que pueden inhibir su funcionamiento. Por eso es de suma importancia en qué tipo de medios debe funcionar nuestro sensor para elegir de manera correcta nuestro principio de reconocimiento.

Los métodos más comunes en la actualidad para determinar niveles de lactato en el cuerpo se hacen a través de muestras sanguíneas que posteriormente son evaluadas en el laboratorio por métodos espectroscópicos. Otra de las alternativas es el uso de sensores electroquímicos. En el sudor, las concentraciones de lactato pueden ir desde 1 mM o menos, estando en reposo, hasta sobrepasar los 40 mM (Ricardo A Escalona-Villalpando et al.,

2017) mientras se realiza alguna actividad física de intensidad, de tal manera que se lleva a cabo un proceso de obtención de energía en el cuerpo en la fase anaeróbica. Por lo tanto, en este trabajo se estudia la utilización de distintos mediadores y enzimas. Principalmente la lactatoxidasasa (LOx) y la lactatodeshidrogenasa (LDH), que puedan extender el rango de detección de estos biosensores electroquímicos con el objetivo de poderlos usar para la detección de lactato en el sudor por medio de un dispositivo auto-alimentado; mejorando de esta manera las mediciones de lactato al hacerlas en tiempo real y con un método no invasivo.

Los biosensores de primera generación hacen uso del hecho que en la naturaleza el grupo prostético de muchas enzimas es reciclado por un co-sustrato de difusión libre. Algunos de estos co-sustratos pueden ser oxidados o reducidos en un electrodo metálico, estos compuestos pueden ser usados como transportadores de electrones entre la enzima y el electrodo. Tanto el incremento en la concentración del co-producto como el decremento en la concentración del co-sustrato son detectados mediante la medición del cambio en la corriente en adición del sustrato a un voltaje adecuado (Habermüller et al., 2000).

Las enzimas oxidasas y peroxidasas, por sí solas pueden dar problemas de interferencia, por lo que resulta común que sean utilizadas junto con compuestos que funcionen como mediadores en la transferencia de electrones, estos mediadores son compuestos sintéticos que por lo general contienen hierro, como por ejemplo el ferrocianuro o el ferroceno. Un mediador electro-químico se encarga de facilitar la transferencia de electrones entre la especie a oxidar y la superficie del electrodo, de manera que se pueden utilizar potenciales menores para la detección (Amor Gutiérrez, 2015)

A estos dispositivos se les denomina sensores de segunda generación. El principio de funcionamiento de un mediador electroquímico consiste en presentar potenciales de oxidación más bajos que el peróxido de hidrógeno, por lo tanto son menos susceptibles a componentes que producen interferencias (Gatti, n.d.). El mediador toma los electrones que obtuvo la enzima, en el caso de la enzima LOx ocurre a partir de la oxidación del lactato, para transferirlos al electrodo de trabajo estableciendo una relación entre la concentración de lactato y la corriente producida al aplicar un voltaje. Estas corrientes cambian en función del voltaje aplicado y se miden a partir de cronoamperometrías o ciclovoltamperometrías.

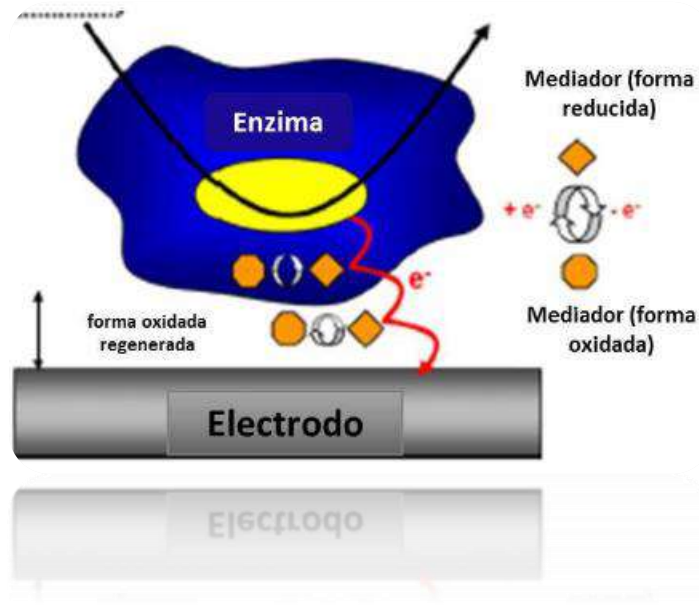


Figura 4.3 Funcionamiento de un mediador electroquímico (DECTOR, 2016).

En algunos casos las enzimas nos permitirán aprovechar las corrientes producidas por las reacciones de reducción y oxidación y producir energía, lo que nos permite utilizar nuestro sensor también como una celda de combustible.

4.1.2 Bioceldas de combustible

El número de dispositivos eléctricos fabricados para diversos medios, desde teléfonos inteligentes o computadoras, hasta dispositivos médicos o sensores, está en constante incremento, por lo que ha crecido el interés en fuentes de energía que no tengan un impacto negativo en el medio ambiente (Rasmussen et al., 2016). Dichas fuentes deben ser capaces de proveer energía de manera constante, ofreciendo voltajes y corrientes estables, con el propósito de no afectar el funcionamiento de los distintos dispositivos alimentados por el mismo. Una celda de combustible (FC) se define como un dispositivo el cual transforma la energía química de un compuesto en energía eléctrica utilizando materiales con propiedades catalíticas. Un subtipo de FC son las bioceldas de combustible (BFC) que generan energía pero lo hace mediante el uso de moléculas biológicas como lo puede ser una enzima.

El tipo de combustible que se empleará depende ampliamente de la aplicación del dispositivo alimentado con este, para el caso de un biosensor que tiene el propósito de analizar fluidos biológicos, es posible aprovechar distintos compuestos fisiológicos, como la glucosa o el ácido láctico. Entre los combustibles que se destacan para la elaboración de celdas de combustible también están el metanol, ácido fórmico, etilenglicol, glicerol, entre otros. Además las celdas de combustible a escalas menores son cada vez más aprovechadas ya que sus flujos de comportamiento laminar ayudan a mantener separados al combustible del comburente.

Otro de los combustibles que se ha investigado es el ácido láctico. Las BFC que llevan a cabo una oxidación anódica con lactato oxidasa emergen como una fuente de poder prometedora, ha aumentado la atención en ellas debido a que existe alta energía característica y una fuente abundante de lactato. Por ejemplo, una biocelda de combustible lactato oxígeno con una salida de $70,000 \text{ mW cm}^{-2}$ fue implantada exitosamente en un brazo humano. También se describen bioceldas puestas en dispositivos tipo parche que usan como ánodo la enzima LOx junto con polímeros lineales y mediadores electroquímicos que pueden adherirse sobre la piel con la intención de usar el sudor como combustible, dicho dispositivo tiene la capacidad de obtener voltajes de alrededor de 0.55 V y corrientes de $140 \mu\text{A cm}^{-2}$ manteniendo un rendimiento de $20 \mu\text{W}$ de manera continua por 30 minutos (R A Escalona-Villalpando et al., 2019), esto gracias a la abundancia de este combustible en el sudor al momento de llevar a cabo un esfuerzo físico.

4.1.2.1 Funcionamiento de una biocelda de combustible

A pesar de que el principio de funcionamiento de una celda de combustible puede parecer bastante similar al de una batería, existen grandes diferencias que también pueden marcar una distinción importante en su funcionamiento. A diferencia de una batería, para que una celda de combustible funcione, se requiere que le sea suministrado un combustible de manera constante, y al mismo tiempo que el combustible y el comburente puedan pasar por medio de su respectivo electrodo.

Mientras que la oxidación del combustible ocurre en el ánodo y la reducción del oxidante ocurre en el cátodo los productos de las reacciones se eliminan de la celda

junto a la corriente líquida del combustible agotado. Así que es necesario un sistema que esté suministrando de manera continua el combustible y el oxidante, a sus respectivos electrodos. A fin de obtener un flujo de electrones se necesita que las reacciones de oxidación y reducción se lleven a cabo por separado.

El potencial de Nernst se puede decir que es el potencial ideal que genera nuestra celda de combustible cuando no existe corriente. Sin embargo, el comportamiento real de la celda cuando comienza tener un flujo de electrones describe pérdidas en el potencial generado debido a distintos factores. En la figura 2 se describe la relación característica que existe entre el voltaje y la corriente que se produce y se puede observar que conforme aumenta la corriente también disminuye el voltaje. Al mismo tiempo la gráfica se divide en 3 zonas las cuales describen la fuente principal de pérdida de voltaje

La región de activación es la zona donde la pérdida de voltaje se da debido al límite en la velocidad de reacción, que está asociada al potencial de activación de una reacción. La región óhmica genera pérdidas debido a la restricción que tienen los electrones para viajar por los elementos presentes, es decir a la resistencia de los distintos componentes de la celda. La región de transporte de masa, como se puede ver, se da a corrientes altas, los reactivos se consumen más rápidamente por lo que las concentraciones de estos disminuyen y esta disminución en su concentración se refleja en una disminución en el voltaje

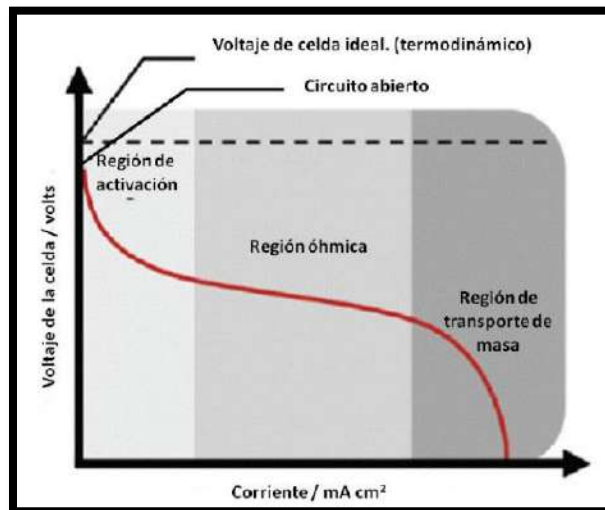


Figura 4.4 Grafico característico de una curva de descarga (DECTOR, 2016).

4.1.2.2 *Bioceldas enzimáticas*

Las bioceldas de combustible enzimáticas son un tipo de celdas de combustible que usan enzimas como electrocatalizador para llevar a cabo la oxidación de un sustrato que fungirá como el combustible de la celda de combustible. Esto ayuda además a que el combustible no tenga que ser de alta pureza ya que la enzima le proporciona selectividad a la celda de combustible para usar un analito como su sustrato (DECTOR, 2016). En la actualidad las celdas de combustible de tipo enzimáticas son incapaces de hacer funcionar un dispositivo electrónico como un celular sin ayuda de componentes eléctricos externos para aumentar el voltaje o corriente de salida, o bien conectando las celdas en serie o en paralelo, sin embargo el interés en el desarrollo de biosensores auto-alimentados (self-powered) está en crecimiento, esto consiste en un dispositivo con la capacidad de producir energía y a la vez cuantificar las concentraciones de este combustible presentes en la muestra (Shitanda et al., 2017).

Usualmente se usan enzimas debido a su gran selectividad y sensibilidad. Las enzimas deben ser capaces de catalizar una reacción de un analito deseado de tal manera que este se convierta en una especie electroactiva, lo que dará lugar a una transferencia de electrones y eventualmente a una corriente eléctrica mediante la cual se evaluará posteriormente la concentración del analito de interés. Uno de sus inconvenientes, posiblemente el más grande, es que con el paso del tiempo estas van perdiendo su actividad enzimática (Cortón, 2000).

Una de las enzimas que se utilizan para la cuantificación de lactato es la lactato oxidasa (LOx). La LOx es una flavoproteína que se obtiene a partir de varias bacterias. Esta enzima cataliza la oxidación del lactato a piruvato formando peróxido de hidrógeno como producto de una reacción entre el lactato en presencia de oxígeno. Aquí el peróxido es el elemento electroactivo. Siendo la oxidación la reacción preferente para la medida de corriente eléctrica (Vizcaya Antolín, 2017).

4.1.3 Métodos electroquímicos

4.1.3.1 Voltamperometría cíclica

El comportamiento electroquímico completo de un sistema se puede obtener a través de una serie de pruebas a diferentes potenciales con el registro de las curvas de tiempo y corriente, para producir una superficie i - t - E tridimensional. Sin embargo, la acumulación y el análisis de estos datos pueden resultar tediosos, especialmente cuando se utiliza un electrodo estacionario ya que escalones de potencial que están muy poco espaciados (p. Ej. 1 mV de distancia) son necesarios para la obtención de curvas i - E detalladas. Se puede obtener más información en un solo experimento barriendo el potencial con el tiempo y registrando la curva i - E directamente. Esto equivale, de manera cualitativa, a atravesar del reino tridimensional i - t - E (Figura 4.5 b) a uno bidimensional i - E , donde el tiempo no está representado gráficamente pero sabemos que el potencial será función del tiempo. Por lo general, el potencial varía linealmente con el tiempo (es decir, la señal aplicada es una rampa de voltaje) con tasas de barrido que van desde $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ hasta aproximadamente $1000 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. En este experimento, se acostumbra registrar la corriente en función del potencial, lo que obviamente es equivalente a registrar la corriente frente al tiempo. El nombre formal del método es cronoamperometría de barrido de potencial lineal, pero puede ser más conocida como voltamperometría de barrido lineal (“Allen J. Bard and Larry R. Faulkner, 2002).

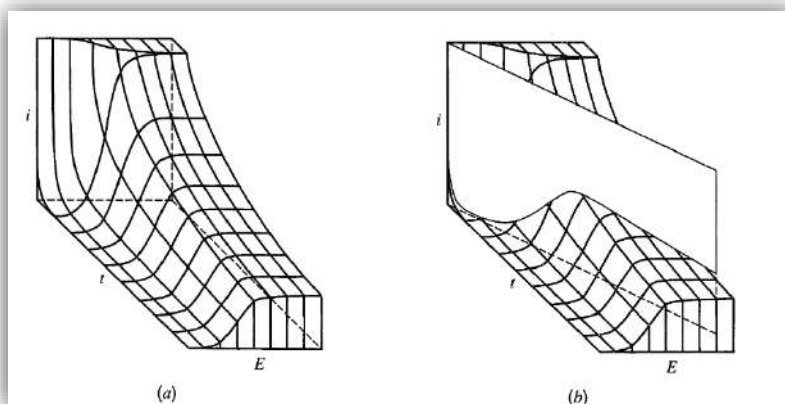


Figura 4.5 a) Representación de una porción de la superficie tridimensional i-t-E. b) Barrido de potencial a través de esta superficie. (“Allen J. Bard and Larry R. 2002)

La aplicación de un barrido de potencial es por medio de un electrodo de trabajo, en un rango específico, con la intención de hacer una medición de la corriente que circula en nuestro sistema estudiado, lo que proporciona información acerca de los potenciales de oxidación y reducción de las especies contenidas en nuestra muestra. El potencial aplicado va desde un potencial inicial hasta un potencial final. En el cual se produce una inversión en el sentido del barrido, por lo que en el principio se ha hecho un aumento en el potencial, al llegar al potencial final, este comenzará a decaer con la misma velocidad, hasta llegar al mismo potencial inicial. Formando así ciclos de potencial aplicado que se repetirán varias veces (Flores, 1995).

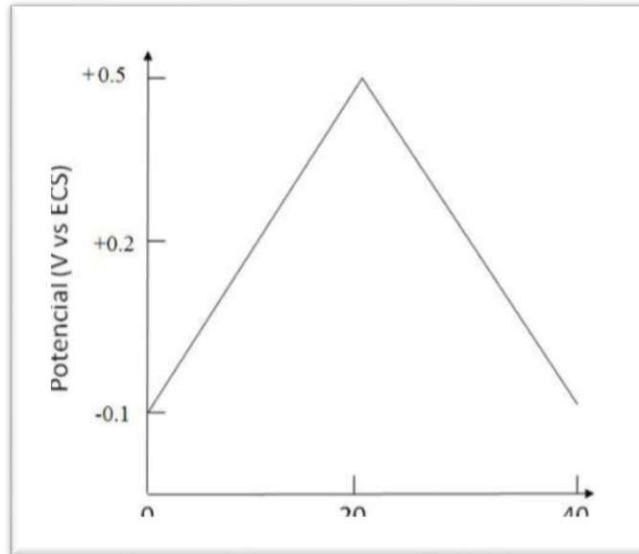


Figura 4.6 Barrido de potencial típico de una voltamperometría (JIMÉNEZ C et al., 2009).

El barrido puede ser iniciado en cualquier sentido anódico o catódico y esta técnica permite repetir este ciclo las veces que sea necesario. Para un sistema reversible, la respuesta corriente-potencial que se obtiene es similar a la siguiente. Esta técnica no tiene igual relevancia para determinaciones cuantitativas, sin embargo, mediante ensayos relativamente sencillos y rápidos es posible obtener un importante conjunto de información (Cano Luna, 2009).

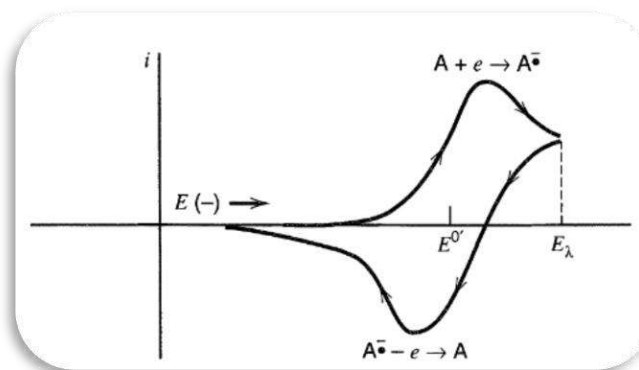


Figura 4.7 Voltamperometría resultante (“Allen J. Bard and Larry R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, New York: Wiley, 2001, 2nd Ed.,” 2002).

4.1.3.2 *Cronoamperometría*

Esta técnica implica la medición de la cantidad de corriente que circula por el circuito de medida, tras un determinado salto de potencial aplicado. Este parámetro, intensidad de corriente, tiene utilidad analítica ya que se relaciona con la concentración del analito que se desea cuantificar. Para ello, se trabaja en condiciones donde el único mecanismo de transporte actuante con el analito es la difusión. Así se obtiene una “corriente límite” que será directamente proporcional a la concentración de analito, para esto se debe emplear un potencial constante y se registra el valor de la corriente en la muestra.

Un instrumento conocido como potenciostato tiene control del voltaje a través del par electrodo de trabajo-contraelectrodo, y ajusta este voltaje para mantener la diferencia de potencial entre los electrodos de trabajo y de referencia (que detecta a través de un circuito de retroalimentación de alta impedancia) de acuerdo con el programa definido por un generador de funciones.

Alternativamente, se puede ver el potenciostato como un elemento activo cuyo trabajo es forzar a través del electrodo de trabajo cualquier corriente que se requiera para alcanzar el potencial deseado en cualquier momento. Dado que la corriente y el potencial están relacionados funcionalmente, esa corriente es única. Químicamente, es el flujo de electrones necesario para soportar los procesos electroquímicos activos a velocidades consistentes con el potencial. Por tanto, la respuesta del potenciostato (la corriente) es en realidad el observable experimental (“Allen J. Bard and Larry R. Faulkner, 2002).

En la cronoamperometría, se observa el comportamiento corriente-tiempo de un sistema electroquímico después de un paso potencial en una solución inmóvil. Considere un sistema donde la especie O es electroactiva en E_i y el potencial del electrodo se eleva a E_f (Figura 4.8 a), donde O se reduce en una simple reacción de transferencia de carga: $O + e \rightarrow R$. E_f se elige así que la concentración de O en la superficie del electrodo permanece cero. La corriente (Figura 4.8 b) se debe solo a la difusión de O hacia el electrodo

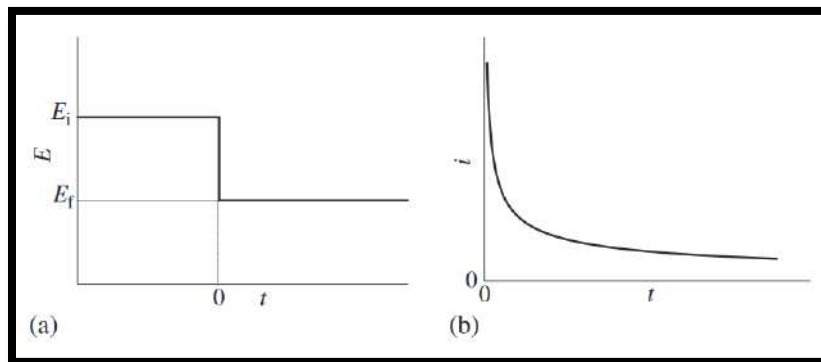


Figura 4.8 Experimento de paso de potencial para un electrodo plano: (a) forma de onda potencial, (b) respuesta de corriente.

4.1.3.3 Voltametría de pulso

Los métodos que emplean formas de onda potenciales complejas que implican combinaciones de barridos y pasos evolucionaron a partir de la polarografía, principalmente para mejorar los límites de detección. Fueron particularmente ventajosos en los experimentos de electrodo de caída de mercurio (DME), donde se observa una corriente de carga continua resultante del crecimiento de la gota. El cambio al electrodo de gota de mercurio estático (SMDE) elimina este requisito. Aplicados a los electrodos estacionarios, los métodos voltamperométricos pulsados producen mejoras significativas.

Estos métodos pueden considerarse como técnicas de potencial fijo en las que la corriente se muestrea después de que el potencial se ha mantenido constante durante un tiempo suficientemente largo, normalmente 40 mseg. La discriminación contra la corriente de carga se logra por tanto muestreando la corriente justo antes del final del pulso (o el final del escalón para una escalera), donde la corriente de carga es despreciable en comparación con el componente farádico. DPV y SWV mejoran aún más la sensibilidad al restar los valores actuales muestreados en dos momentos diferentes. SWV combina las ventajas de los otros tres y ofrece mejoras significativas. El resultado es una respuesta voltamétrica similar a una gaussiana, caracterizada por una excelente supresión de la corriente de fondo y produciendo información cuantitativa mejorada con una gama más amplia de escalas de tiempo.

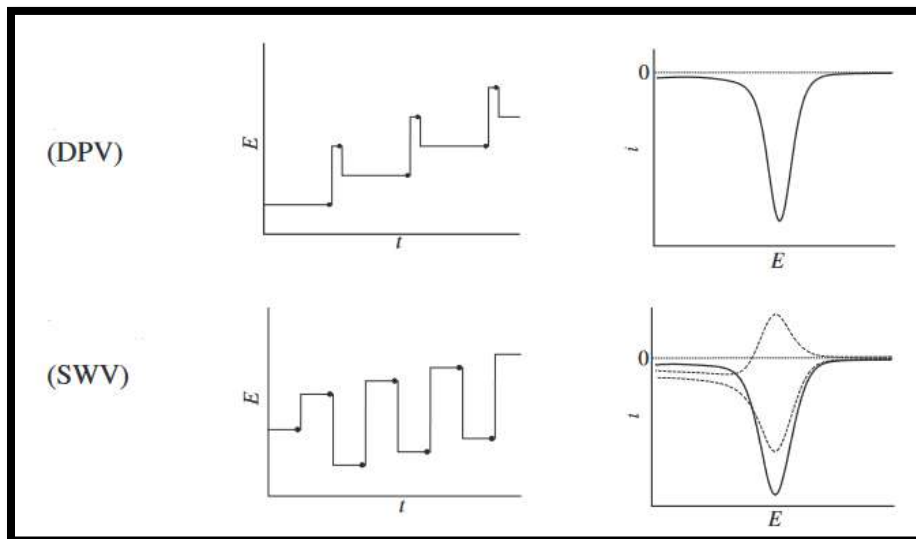


Figura 4.9 Grafica representativa de DPV y SWV

4.1.4 Métodos de inmovilización enzimática

La inmovilización de la enzima es uno de estos factores clave en la fabricación del biosensor. Algunas enzimas presentan una estabilidad intrínseca mientras que otras pierden su actividad al ser retiradas de su medio natural, de ahí que sea de suma importancia su correcta inmovilización, que siempre conllevará una cierta pérdida de la actividad de la misma. El objetivo es optimizar la estabilidad de la enzima y la eficiencia de las reacciones, para ello se debe inmovilizar la enzima en su forma activa y mantener ese estado de activación, evitando así que se vea afectada por agentes externos (Vizcaya Antolín, 2017).

Existe gran variedad de métodos de inmovilización de enzimas incluyendo la adsorción física, confinamiento por membrana, enlace covalente, formación cross linking, electropolimerización, formación de mono-capa por auto ensamblaje, entre otros. El atrapamiento físico implica atrapar la enzima en matrices de polímeros o matrices sol-gel. En esto, la enzima se mezcla con precursores sol-gel o con monómeros que se reticulan mediante electropolimerización, mediante irradiación gamma, isocianato y otros agentes, o las enzimas se atrapan mediante interacciones electrostáticas. En el método sol-gel, se forma una red de gel de sílice alrededor de la enzima de interés y la condensación química. Tal cobertura con el recubrimiento sirve para extender el rango lineal mediante la reducción

de la concentración de sustrato local y para eliminar posibles interferencias (por ejemplo, especies electroactivas coexistentes) (Rathee et al., 2016).

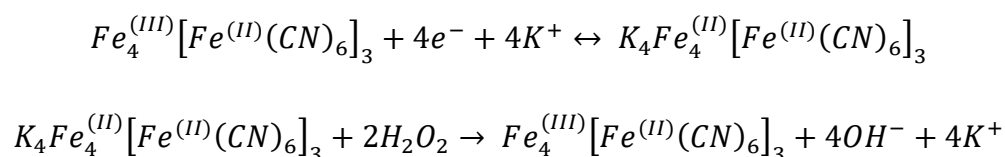
4.1.4.1 Método de inmovilización de LOx con $K_3Fe(CN)_6$

Tomando en consideración los efectos de las sustancias fácilmente oxidables contenidas en las muestras es recomendable el uso de mediadores electroquímicos, se eligieron como mediadores iones ferricianuro, que se oxidan electroquímicamente a un voltaje relativamente menor al voltaje necesario para oxidar peróxido de hidrógeno. En una reacción enzimática, los iones ferricianuro producen iones ferrocianuro en cantidades que dependen de la concentración del sustrato. Los iones de ferrocianuro se oxidan en el electrodo a 0,4 V mediante técnicas electroquímicas (Sato & Okuma, 2006).

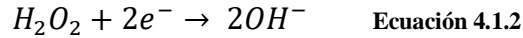
4.1.4.2 Método de inmovilización de LOx con Azul de Prusia

La medición eficaz del peróxido de hidrógeno sigue siendo un objetivo analítico crítico debido a su uso generalizado en diversos campos, como el procesamiento de alimentos, la industria textil, el blanqueo de pulpa y papel, la investigación farmacéutica, la química clínica, los agentes antisépticos y desinfectantes. En nuestro caso puede ser de interés ya que es uno de los productos de la enzima LOx al oxidar al lactato. Se ha empleado una amplia gama de materiales, como proteínas redox, metales de transición y polímeros redox, para realizar la detección electrocatalítica de H_2O_2 . El hexacianoferrato férrico o azul de Prusia (PB) se ha denominado "peroxidasa artificial". Se reduce electroquímicamente para formar blanco de Prusia (PW), que es capaz de catalizar la reducción del peróxido de hidrógeno a potenciales bajos (alrededor de 0 V vs. Ag / AgCl), lo cual es una característica excelente ya que le permite trabajar en presencia. de una amplia gama de interferencias (Cinti et al., 2014).

La acción catalítica de PW, producida por la reducción electroquímica de PB en la superficie del electrodo, hacia la reducción de H_2O_2 se puede describir de la siguiente manera:



Por tanto, la reacción neta, considerando las ecuaciones anteriores la reducción de H_2O_2 a iones hidróxido, que se puede describir de la siguiente manera:



4.1.5 Compuestos análogos al azul de Prusia

Este material se denomina un análogo del azul de Prusia (Guo et al., 2020) que se refiere a un material que tienen composiciones definidas de cationes metálicos, que actúan como nodos que están unidos por grupos de cianuro que actúan a su vez como puente (Jiao et al., 2017). En este caso esta estructura está conformada por cobre, hierro y cianuro de manera similar a como se muestra en la siguiente imagen.

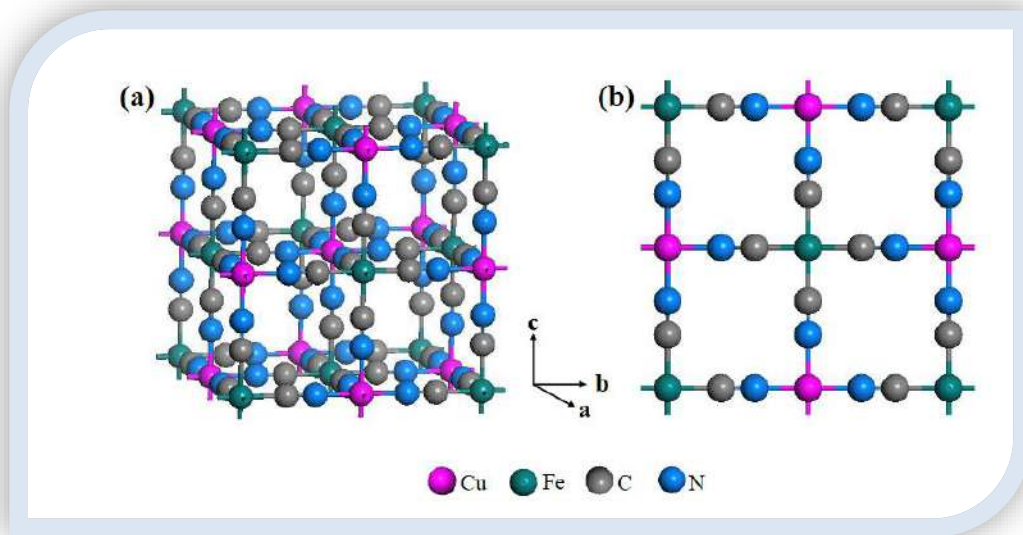


Figura 4.10 (a) La estructura de $Cu_3[Fe(CN)_6]_2$ en tres sistemas de coordenadas (b) y plano bc (Jiao et al., 2017).

4.2 Justificación

El propósito del proyecto es diseñar y desarrollar un dispositivo de forma reproducible que sea capaz de cuantificar las concentraciones de lactato presentes en el sudor, lágrimas, sangre o saliva de manera inmediata, buscando que tenga una buena

linealidad y, además que la información obtenida de este sean confiable, con la finalidad de que sea empleado en diferentes escenarios, dando así información importante acerca del estado de salud de una persona, ya sea un deportista que busca optimizar su régimen de entrenamiento o un paciente en una consulta médica.

Para hacer esto se propone desarrollar un electrodo que servirá como biosensor-biocelda y estará compuesto por un cátodo con la enzima lacasa y un ánodo con la enzima LOx o con un material selectivo. Sin embargo, las concentraciones de lactato en el sudor presentan un reto, ya que pueden alcanzar concentraciones relativamente altas, en donde la respuesta de los sensores puede perder su linealidad. Por otro lado las concentraciones en saliva, lágrimas o sangre son menores y en estos rangos a veces puede resultar complicada la cuantificación del mismo, por lo que es importante considerar las características del material para saber en qué medio puede utilizarse.

Se han reportado biosensores enzimáticos de lactato con la capacidad de medir las concentraciones que se presentan en sudor, saliva, lagrimas o sangre mediante mediadores eléctricos como el ferrocianuro y otros compuestos que contienen hierro, dando lecturas fiables de las concentraciones de lactato en diferentes medios, sin embargo, en algunos casos se presenta el inconveniente que debido a los altos potenciales de oxidación de este mediador no es práctico volver a utilizarlo, y no se pueden lograr mediciones consecutivas (Sato & Okuma, 2006).

Por otro lado recientemente se ha despertado interés en el desarrollo de biosensores no enzimáticos que sean selectivos con la molécula del lactato para así poder sensar las concentraciones de lactato sin la necesidad de utilizar una enzima para este propósito. Sin embargo hasta el momento la mayoría de estos materiales solo presentan la capacidad de oxidar y reducir a esta molécula en soluciones que tengan un valor de pH básico y no muestran actividad a pH's neutros o ácidos. En este trabajo se evaluará el desempeño de distintos métodos de inmovilización enzimática, mediadores eléctricos y materiales abióticos para lograr los objetivos planteados.

4.3 Hipótesis

El desarrollo de electrodos basados en compuestos derivados del ferricianuro para la obtención de un material lo suficientemente reproducible para ser probado en diferentes medios y permitir el desarrollo y optimización de un biosensor de lactato, así como evaluar su posible aplicación como una celda de combustible.

4.4 Objetivos

4.4.1 Objetivo general

Desarrollar electrodos basados en compuestos derivados del ferricianuro y otros compuestos metálicos como el óxido de hierro o cobre, para la construcción de biosensores y bioceldas de combustible flexibles para la cuantificación y generación de energía utilizando lactato como combustible.

4.4.2 Objetivos específicos

2.2.1 Evaluar diferentes métodos de inmovilización de la enzima LOx a partir de mediadores electroquímicos y la aplicación de materiales abióticos selectivos.

2.2.2 Caracterizar los electrodos por métodos fisicoquímicos, microscópicos y electroquímicos.

2.2.3 Optimizar los electrodos para el sensor de lactato, buscando las mejores condiciones de pH.

2.2.4 Desarrollar los electrodos de LOx para una biocelda de combustible de lactato, definiendo el material para el ánodo, la concentración óptima y cuanta corriente producirá, utilizando como cátodo lacasa.

2.2.5 Desarrollar de biocelda y biosensor a partir de los electrodos.

5 Materiales y métodos

5.1 Reactivos

Lactato oxidasa (LOx) *Aerococcus viridans* (U/g), Ferricianuro de potasio, Lactato de sodio (Merck), polivinil pirrolidona (PVP) y Cloruro de hierro de Sigma-Aldrich. NaHPO_4 y KH_2PO_4 de J.T. Baker. Etilen glicerol diglicidil éter (EGDGE) fue obtenido de proporcionado por la Universidad of Utah. Los nanotubos de carbono de Merck.

5.2 Síntesis de partículas de Azul de Prusia

Se realizó una solución de 90 mL añadiendo 30 mL de FeCl_3 0.1 M a una solución de 60 mL de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0.1 M que se agitó durante 5 minutos. Posteriormente fue centrifugada y lavada 3 veces con agua desionizada y una vez metanol para obtener el precipitado. Se resuspendió el precipitado, se filtró y finalmente se evaporó para obtener el residuo sólido (Haghighi et al., 2010).

5.3 Síntesis de partículas de CuFe-PBA

Se preparó una solución de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ y M $\text{K}_3\text{Fe}[\text{CN}_6]$ 2:1 v/v y 1.5 g de PVP en relación 33.3 mL de agua DI v/v. Se agitó durante 30 minutos, se centrifugó y posteriormente fue lavado con agua y etanol varias veces. El precipitado se dejó secar a 60°C durante 24 h (Guo et al., 2020).

5.4 Preparación de electrodos de $\text{K}_3\text{Fe}[\text{CN}_6]/\text{LOx}/\text{Agar}$

Este electrodo para el sensor de L-lactato se elabora por medio de dos procedimientos muy similares. Para el primer procedimiento, una alícuota de 5 μL de 0.1M de buffer de fosfato (pH 7.4) que contiene 100 mM de ferricianuro potásico y 0.5% de agar a una temperatura de 60°C se colocó sobre el electrodo. Posteriormente se añadió la solución con la enzima a la muestra señalada anteriormente por una alícuota de 5 μL (0.5 U) para cada electrodo. Para el segundo procedimiento tanto la solución buffer como la solución con la enzima se mezclaron y posteriormente se colocaron sobre el electrodo en una superficie de 0.25 cm^2 (Sato & Okuma, 2006).

5.5 Preparación de electrodos de nanopartículas de Fe₂O₃

Se dispersaron 2.5 mg de nanopartículas de Fe₂O₃ en una suspensión de 182.5 µL de isopropanol y 17.5 µL de nafión, posteriormente se agitó por 1 minuto en el vortex y se sonicó 30 segundos, repitiendo estos últimos dos procesos al menos 3 veces para lograr una dispersión correcta de las partículas. Una vez lograda una buena dispersión se depositó 20 µL sobre la superficie de los electrodos de 0.25 cm² de área y se dejó secar al menos 1h.

5.6 Preparación de electrodos de Azul de Prusia/LOx/EGDGE

Se preparó una suspensión de azul de Prusia 10 mg/mL con un volumen de 1 mL de agua y etanol en relación de volumen 1:1. Se mezclaron 40 mL de esta solución con 20 mL de solución enzimática y 2 µL de EGDGE, posteriormente se colocó en el vortex durante algunos minutos. Finalmente se depositaron 20 µL de esta mezcla sobre la superficie de 0.25 cm² de los electrodos tratando de que sea colocada homogéneamente sobre los electrodos y se dejan secar durante 12 h.

5.7 Preparación de electrodos de CuFe PBA

Se dispersaron de nanopartículas de FeCu en isopropanol y nafión en una relación de 1/73/7 w/v/v, posteriormente se agitó por 1 minuto en el vortex y se sonicó 30 segundos, repitiendo estos últimos dos procesos al menos 3 veces para lograr una dispersión correcta de las partículas. Una vez lograda una buena dispersión se depositó 20 µL sobre la superficie de los electrodos de 0.25 cm² de área y se dejó secar al menos 1h.

5.8 Evaluación de los electrodos por métodos electroquímicos.

Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado, excepto los especificados. Los experimentos electroquímicos fueron realizados con/sin agitación usando un potenciostato marca Epsilon y BioLogic SAS Science Instrument VSP. Los electrodos fueron evaluados en distintas soluciones buffer a diferentes pH con el fin de evaluar la actividad del sensor en estos diferentes valores de pH, usando un electrodo de calomel o Ag/AgCl como electrodo de referencia y grafito como contra electrodo. Las voltamperometrias cíclicas (VC) se realizaron a una velocidad de barrido de 10 mV·s⁻¹ y un

rango de potencial variable, mientras que los experimentos de amperometría se realizaron aplicando diferentes voltajes específicos para cada material de manera constante para cada prueba. Por último las pruebas de voltametría de pulso diferencial fueron realizadas de un potencial inicial de -0.3 V a un potencial de 0.4 V, teniendo como parámetros una amplitud de 10 mV, un ancho de pulso de 100 ms, un incremento de potencial de 2 mV y un tiempo de muestreo de 300 ms.



Figura 5.1 Acomodo de electrodos usado para la realización de pruebas electroquímicas.

5.9 Evaluación de los electrodos de LOx para una biocelda de combustible de lactato

Los electrodos usados fueron un ánodo que contenga nuestra enzima y su mediador electroquímico o el material abiótico mientras que el biocátodo fue derivado de la enzima lacasa unida a nanotubos de carbono multipared sin modificación y modificados con antraceno o pireno-antraceno, los experimentos se llevaron a cabo sin agitación en una solución de PBS 0.1 M con un pH 5.6 en un solo compartimento. Para determinar el funcionamiento de la biocelda se hicieron curvas de descarga lineales desde potencial a circuito abierto a cero V con un barrido de 10 mV·s.

6 Resultados y discusión

6.1 Evaluación de electrodos de $K_3Fe[CN_6]/LOx/Agar$

Uno de los primero métodos elegidos para la inmovilización de LOx fue por transferencia mediada de electrones a través del ferricianuro de potasio debido a que este método ha reportado por otros autores (Sato & Okuma, 2006) con características que cumplen algunos de los objetivos que se tienen en este trabajo, por lo que se propuso estudiar el método propuesto por (Sato & Okuma, 2006) y hacer modificaciones al método con el objetivo de que cumpla completamente con el funcionamiento deseado, haciendo modificaciones igualmente teniendo en cuenta que los electrodos utilizados en este trabajo son de distinta composición que los estudiados en la literatura.

Para realizar la evaluación de los electrodos derivados de $K_3Fe[CN_6]/LOx/Agar$ se utilizó la técnica de voltamperometría cíclica (VC) en un rango de -0.3 V a 0.6 V porque los picos redox del mediador pueden ubicarse dentro de ese rango. Cabe mencionar que se utilizó la VC para dar seguimiento a la reacción, ya que con las técnicas de amperometría realizadas a un voltaje constante de 0.3 V no mostraron cambios de corriente frente a los cambios de concentración de lactato, esto debido a que es necesaria la aplicación de un voltaje considerable en la parte de oxidación para que el material vuelva a su estado oxidado y tenga la capacidad de oxidar a la molécula de lactato posteriormente, por lo que en una cronoamperometría no puede observarse su actividad y es necesario la aplicación tanto de potencial de reducción como de oxidación para poder lograr mediciones continuas de las concentraciones de lactato presentes en las muestras (Sato & Okuma, 2006).

En la Figura 6.1 mediante la técnica de VC, se observan un par de picos definidos en 0.225 V y - 0.03 V (vs. Ag/AgCl) pertenecientes a la oxidación y reducción de $K_3Fe[CN_6]$ respectivamente, como se ha reportado por otros autores (Sato & Okuma, 2006). Las corrientes del pico en sentido de oxidación fueron de 0.033 μA y en el sentido de reducción fue de -0.047 μA en PBS pH 7.4, a una velocidad de barrido de 10 $mV s^{-1}$ sin la adición de lactato. Posteriormente, en presencia de lactato, se observó un aumento en la corriente de los picos redox debido a la oxidación del lacato por la enzima LOx y su transferencia de electrones al medidor electroquímico. La corriente de oxidación aumentó a

0.054 μA mientras que la de reducción aumento a $-0.083 \mu\text{A}$ para 10 mM, en 20 mM las corriente de oxidación y reducción fueron $0.069 \mu\text{A}$ y $-0.01 \mu\text{A}$ respectivamente, en 30 mM las corriente de oxidación y reducción fueron $0.093 \mu\text{A}$ y $-0.125 \mu\text{A}$ respectivamente, para 40 mM las corriente de oxidación y reducción fueron $0.110 \mu\text{A}$ y $-0.144 \mu\text{A}$ respectivamente y por último para 50 mM las corrientes de oxidación y reducción fueron $0.125 \mu\text{A}$ y $-0.161 \mu\text{A}$. Por lo que es notable el cambio de corriente frente a los cambios en la concentración de lactato presente en el medio. Se observa un cambio en la corriente tanto en el sentido de oxidación como en el sentido de reducción, mostrando una reacción reversible correspondiente a la formación del par ferri-ferro.

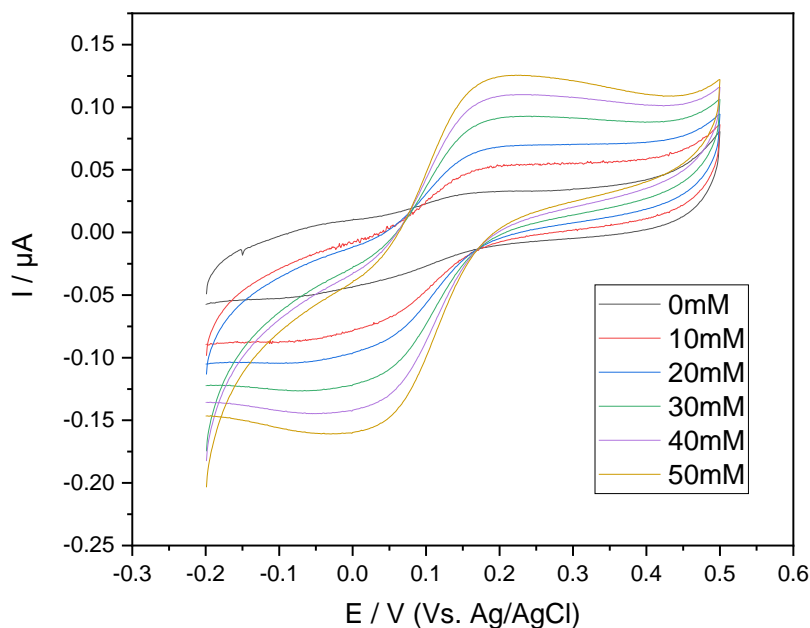
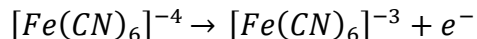
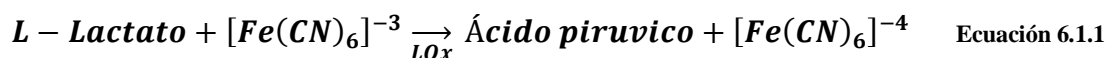


Figura 6.1 Voltamperometrías cíclicas de $\text{K}_3\text{Fe}[\text{CN}_6]/\text{LOx}/\text{Agar}$ método A a diferentes concentraciones de lactato en PBS pH 7.4 (0.1 M) a una velocidad de barrido de $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Los iones de ferrocianuro se oxidan electroquímicamente en el electrodo a 0,3 V. La forma oxidada del mediador de transferencia de electrones reacciona y a continuación, el mediador se reoxida electroquímicamente a un potencial adecuado de la siguiente manera:



En una reacción enzimática, los iones de ferricianuro producen iones ferrocianuro en cantidades que dependen de la concentración del sustrato para que posteriormente la oxidación del material produzca una corriente linealmente dependiente a esta concentración (Sato & Okuma, 2006).

Haciendo el seguimiento de esta reacción en el potencial de oxidación (0.3 V) se obtuvo un triplicado mediante el cual se calcularon los parámetros importantes de nuestro sensor de lactato en un rango lineal de 0 a 50 mM con la siguiente ecuación $y = 2.08 \times 10^{-3}x + 4.9 \times 10^{-2}$ ($R^2 = 0.996$). Otros parámetros obtenidos del electrodo son un límite de detección de 4.5 mM, un límite de cuantificación de 14.4 mM, una sensibilidad de $2.08 \times 10^{-3} \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$. Los límites de detección y cuantificación son grandes debido a la alta dispersión de las corrientes para los blancos, pues sobrepasan el rango lineal del sensor, esto puede ser debido a la poca afinidad entre la superficie del electrodo y el ferricianuro, puesto que fue observado durante la experimentación que el material depositado sobre la superficie del electrodo se desprendía al entrar en contacto con el buffer utilizado para realizar las pruebas electroquímicas como se muestra en la Figura 5.1. Los valores de los límites de detección y cuantificación se calcularon mediante las siguientes ecuaciones.

$$LOD = \frac{3\sigma_b}{m} = \frac{3(3 \times 10^{-9})}{1 \times 10^{-9}} = 4.5 \text{ mM}$$

$$LOQ = \frac{10\sigma_b}{m} = \frac{10(3 \times 10^{-9})}{1 \times 10^{-9}} = 14.4 \text{ mM}$$

Donde se puede apreciar que la sensibilidad del sensor es relativamente alta en comparación con las desviaciones estándar de los blancos, lo que resulta en valores de los límites de detección y cuantificación altos, para este último incluso excede el rango de concentraciones usadas durante las pruebas. Cabe mencionar que el valor de la desviación

estándar de las bases σ_b fue calculado a partir de los valores de corriente a una concentración de 0 mM de lactato.

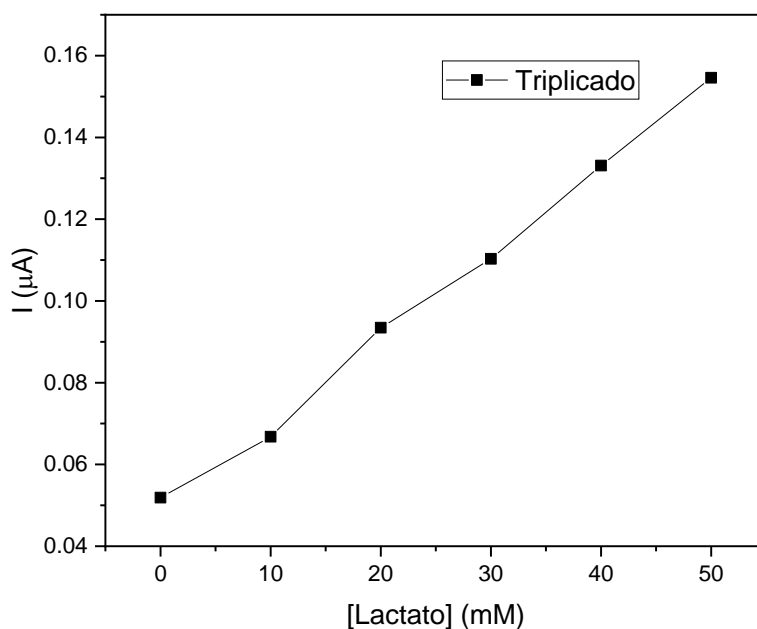


Figura 6.2 Triplicado de voltamperometrias cíclicas a 300 mV con electrodos de $K_3Fe[CN_6]/LOx/Aga$.

Además mediante la ecuación de Lineweaver-Burk se calculó una constante de Michaelis-Menten aparente de 19.8 mM, esta se denomina aparente debido a que no se calcula a partir de la velocidad de reacción, sino que se calcula a partir de la corriente medida mediante técnicas electroquímicas, por lo que puede interpretarse como el valor de la concentración de lactato en donde la corriente obtenida es la mitad de la corriente máxima cual tiene un valor de 0.196 μA . Esto significa que a 19.8 mM alcanzaremos un valor de corriente de 0.5 veces la corriente máxima. La constante de Michaelis-Menten (MM) aparente y la corriente máxima se obtuvieron mediante la obtención de la pendiente y la ordenada al origen de la ecuación de Lineweaver-Burk mediante un ajuste lineal de los inversos de los valores experimentales de concentración y corriente como se muestra en la Figura 6.3.

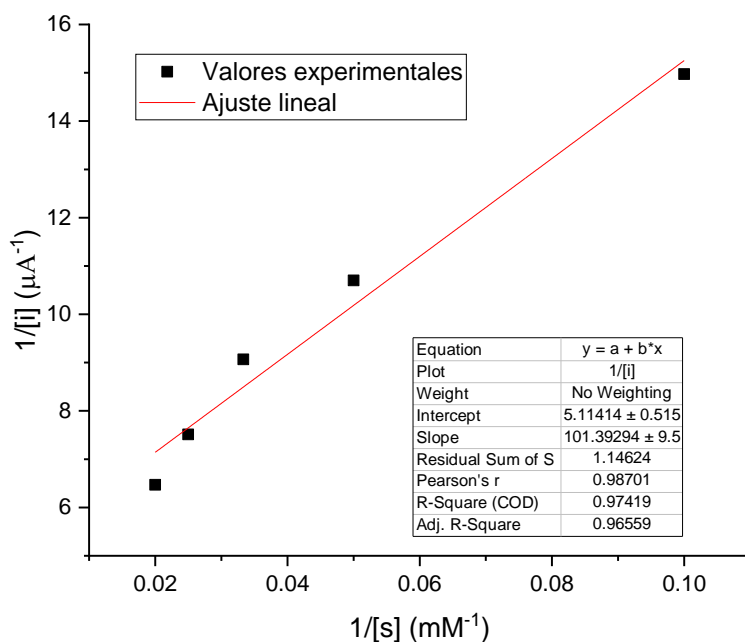


Figura 6.3 Grafica y obtención de ordenada al origen y pendiente de la ecuación de Lineweaver-Burk a partir de los datos experimentales.

Siguiendo la ecuación de Lineweaver-Burk tenemos que

$$\frac{1}{i} = \frac{K_{map}}{i_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{i_{max}} \quad \text{Ecuación 6.1.2}$$

En donde i es la corriente medida mediante VC y $[S]$ es la concentración de sustrato. Por lo tanto el inverso de la ordenada al origen será i_{max} y la multiplicación del inverso de la ordenada al origen por la pendiente de esta recata será K_{map} . Es decir

$$i_{max} = \frac{1}{5.11 \mu A^{-1}} = 0.196$$

$$K_{map} = (101.39 \text{ mM} \cdot \mu A^{-1})(0.196 \mu A) = 19.8 \text{ mM} \quad \text{Ecuación 6.1.3}$$

Por lo que la falta de reproducibilidad en los electrodos y la alta dispersión de los datos fueron las principales razones por las cuales se optó por hacer algunas modificaciones al método y estudiar.

Para mejorar la respuesta electroquímica del mediador con LOx, se realizó una ligera modificación al método anterior con el objetivo de evaluar los electrodos y mejorar el del biosensor. La modificación consistió en depositar la enzima y el mediador electroquímico en un solo paso, es decir, se mezcla la solución con el mediador electroquímico y la solución enzimática en la misma relación en la que era depositada sobre el electrodo y posteriormente se deposita sobre la superficie del electrodo. Se esperaba que esto pudiera mejorar la interacción entre la enzima y el sustrato con el objetivo de lograr corrientes mayores y obtener una menor deserción en los datos debida a este aumento entre la interacción entre la enzima y el mediador. Sin embargo, como puede verse en la Figura 6.4 los picos de oxidación y reducción tienen distintas formas a lo visto en el otro método, a pesar de que el rango de corriente no tiene tantas diferencias es evidente, sobre todo para el pico de oxidación, que los cambios de corriente frente a la concentración no son tan notables y no corresponden los cambios de corriente con los cambios de concentración en el medio por lo que los cambios en la corriente no nos dejan apreciar los cambios en la concentración. Esto pudiera deberse a que al mezclar la solución del mediador con la de la enzima la interacción entre estos bloquee el sitio activo de la enzima en mayor proporción que si se agrega la enzima sobre el electrodo como paso posterior a agregar y dejar secar el mediador en el mismo, lo que hace que la enzima esté más disponible para interaccionar con el medio.

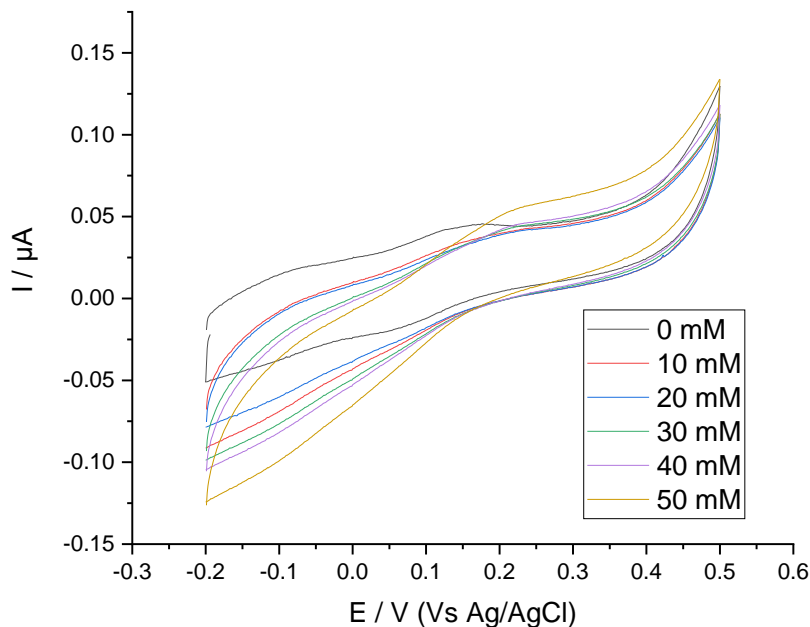


Figura 6.4 Voltamperometrías cíclicas de $K_3Fe(CN_6)/LOx/Agar$ método B a diferentes concentraciones de lactato en PBS pH 7.4 (0.1 M) a una velocidad de barrido de $10\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Además de estas modificaciones también se probó cambiar la concentración del mediador electroquímico que originalmente se preparaba a 0.1 M, se probó aumentar la concentración a 0.25 M y a 0.5 M, así como disminuirla a 0.05 M. Sin embargo esta modificación no mostró mejoras significativas en el desempeño de los electrodos. Por lo que finalmente se optó por probar otros mediadores electroquímicos.

6.2 Electro oxidación de lactato a altos voltajes con de Fe_2O_3 NP's

El siguiente método utilizado es una suspensión de nanopartículas de óxido de hierro (Fe_2O_3 NP's) fue seleccionado debido a los buenos resultados que se obtuvieron del sensado de lactato de manera colorimétrica con estas partículas, donde el lactato es reducido por las partículas y por lo tanto la reducción del compuesto causa un cambio en su coloración (Hao et al., 2016).

A diferencia del método visto anteriormente, las nanopartículas de Fe_2O_3 no funcionan como mediador electroquímico entre la enzima LOx y nuestro electrodo, sino que estas

nanopartículas son sensibles a la presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Hao et al., 2016) el cual es un producto de la acción de la enzima durante la oxidación del lactato junto con el piruvato. Por lo que se esperaría que la concentración de lactato se pudiera seguir mediante la concentración de H_2O_2 presente en el medio. En la Figura 6.5. Puede verse el efecto mediante VC que se tenía pensado era debido a la sensibilidad del el material por el peróxido de hidrógeno, se realizó un barrido de potencial de -0.55V a 1.5V a una velocidad de barrido de $10\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ PBS con un pH de 5.6, en donde justo en los límites de este rango podemos encontrar los mayores picos de reducción y de oxidación del material. A partir de aquí se decidió probar primero a un pH de 5.6 el resto de los métodos debido a que este es el pH del sudor, el cual es el medio de mayor interés en este trabajo.

En la Figura 6.5 b) se muestra la gráfica que compara la corriente medida a un potencial de oxidación de 1.5V para cada una de las adiciones de lactato que fueron de 0 a 50 mM, en donde puede verse que la diferencia de corriente para cada adición con respecto a la concentración de lactato anterior es de $60\text{ }\mu\text{A}$ en promedio para las adiciones de 5 a 50 mM, solamente la primera adición no sigue esta tendencia con respecto a la concentración blanco, ya que la corriente medida a 0 mM de lactato es $13.4\text{ }\mu\text{A}$ mayor a la corriente medida a una concentración de 5 mM de lactato al mismo potencial de 1.5V . También puede observarse que en la parte de reducción a -0.5V que hay un aumento de la corriente con respecto a la concentración de lactato pero esta no es tan marcada como en el caso de la oxidación.

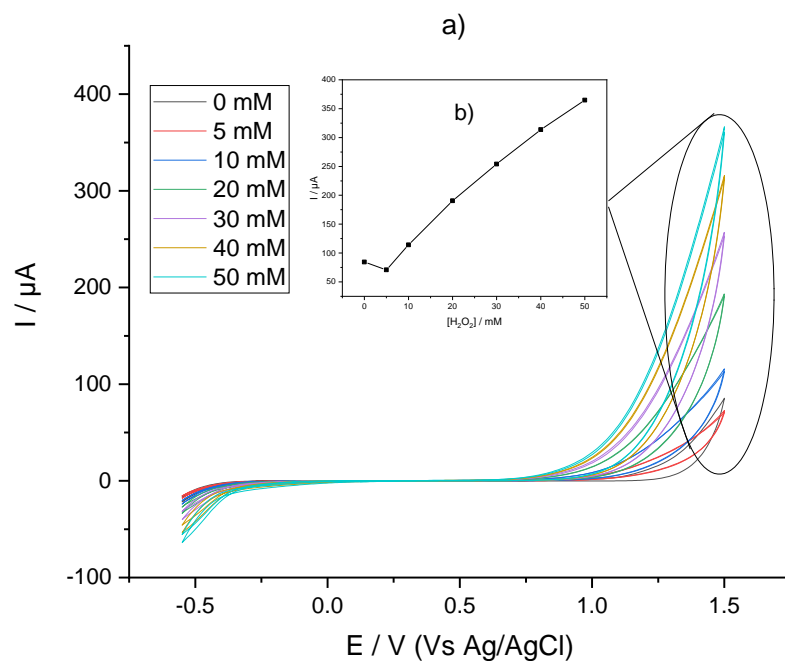


Figura 6.5. Voltamperometrías cíclicas de nanopartículas de Fe_3O_2 a diferentes concentraciones de H_2O_2 en PBS pH 5.6 (0.1 M) a una velocidad de barrido de $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. b) Dependencia de la corriente con la concentración de H_2O_2 en un potencial de oxidación de 1.5 V en la voltamperometría cíclica (a).

Posteriormente se hicieron voltamperometrías en este mismo rango de voltaje pero adicionando al mismo tiempo la enzima LOx sobre la superficie del electrodo posteriormente a adicionar la suspensión con las partículas de Fe_3O_2 , en donde se observó un efecto muy parecido al que tenían los electrodos con las nanopartículas y la adición de peróxido de hidrogeno, ya que se busca que el bioelectrodo sea sensible a este mismo, lo que en un principio nos sugería que se estaba llevando el proceso que se deseaba en un principio. Sin embargo se hizo este mismo procedimiento pero sin la adición de la enzima LOx sobre la superficie del electrodo que se muestra en la Figura 6.6, con esta figura podemos observar que tanto con y sin enzima los electrodos con nanopartículas de Fe_3O_2 parecen ser sensibles a las adiciones de lactato, lo cual se hace más notables cercano a los voltajes más exteriores del barrido de las voltamperometrías. Tanto en el caso de los electrodos con enzima y sin enzima se muestran corrientes similares entre sí pero menores al caso de las adiciones de peróxido de hidrogeno. Por lo que se optó posteriormente a

hacer pruebas amperométricas para determinar si existía mayor diferencia entre la señal obtenida con y sin enzima y además explorar la posibilidad de que el efecto visto no se debiera al material sino a los altos potenciales de oxidación y que realmente se estuviera viendo un ejemplo de electrooxidación del lactato (Sedeno et al., 2016).

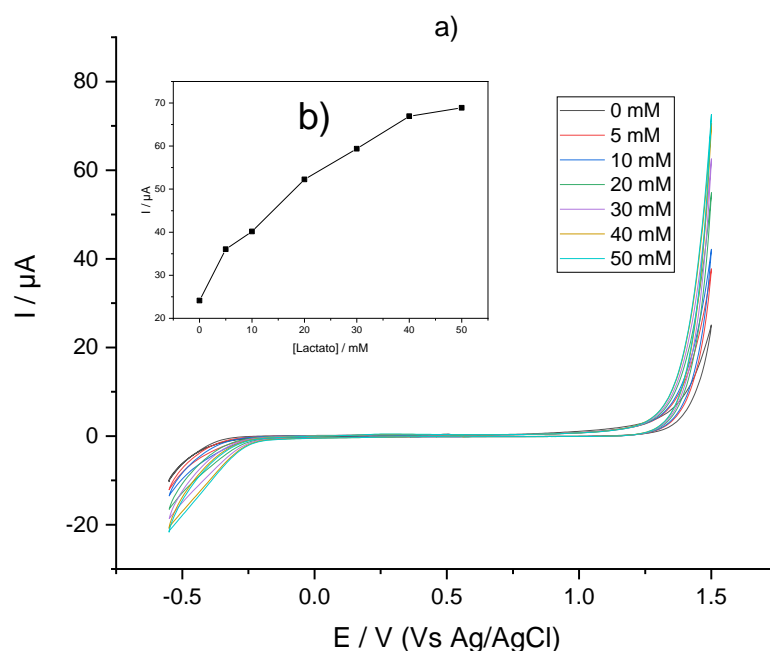


Figura 6.6 a) Voltamperometrías cíclicas de nanopartículas de Fe_2O_3 a diferentes concentraciones de lactato en PBS pH 5.6 (0.1 M) a una velocidad de barrido de $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. b) Dependencia de la corriente con la concentración de lactato en un potencial de oxidación de 1.5 V en la voltamperometría cíclica (a).

La prueba amperométrica se realizó evaluando dos electrodos únicamente con el papel de carbón toray, dos electrodos de nanopartículas de Fe_2O_3 y dos electrodos de nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-ZnO}$, este último es un material que también fue probado por el grupo de trabajo previamente que de igual manera mostró tener sensibilidad a la presencia de peróxido. En estas pruebas se realizaron adiciones de lactato desde 0 hasta 50 mM para ambos blancos y un electrodo de cada material y se realizaron las mismas adiciones de peróxido de hidrogeno para un electrodo de cada material (Figura 6.7), con el fin de comparar la respuesta de cada material con el peróxido y con el lactato y, verificar si la respuesta obtenida es debida a procesos de oxidación promovidos por los materiales utilizado o por la

electrooxidación de las moléculas presentes en la solución. Se realizaron 10 de peróxido de hidrogeno de 5 en 5 Mm hasta 50 mM, mientras que las adiciones de lactato fueron de 2 en 2 mM hasta 10 mM y posteriormente de 5 en 5 mM hasta 50 mM, ambas se realizaron en PBS de pH 5.6 a un potencial de oxidación de 1.5 V en agitación constante. Con esto se pudo confirmar que la señal vista en las nanopartículas de Fe_2O_3 es debida a la electrooxidación del lactato (Sedenho et al., 2016), ya que como se puede ver en la siguiente figura, los electrodos que fueron probados solo con el papel toray en la solución también tuvieron una respuesta a los cambios de concentración de lactato y dicha respuesta es aún mejor que la respuesta de los electrodos a los que sí se les adicionaron nanopartículas en la superficie y se les adicionó lactato.

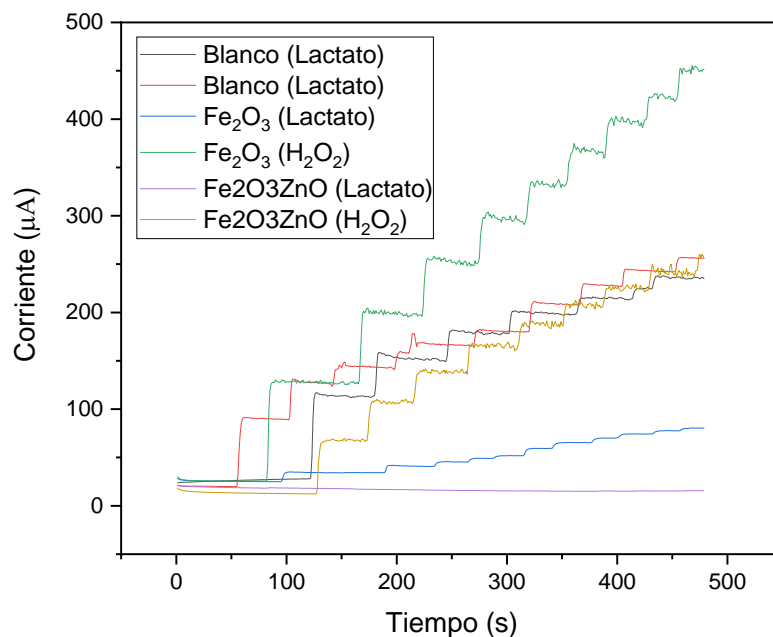


Figura 6.7. Amperometrías de electrodos con Fe_2O_3 y $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-ZnO}$ con adiciones de lactato y peróxido de hidrogeno.

6.3 Evaluación de electrodos de Azul de Prusia/ LO_x /EGDGE

Al igual que el material visto anteriormente, el azul de Prusia (PB) es un material que se ha reportado que tiene sensibilidad a la presencia de peróxido de hidrógeno por lo que es un

buen candidato para sensar la presencia de esta molécula en la oxidación de lactato mediante el uso de la enzima LOx inmovilizado con las partículas de PB sobre la superficie de un electrodo. Debido a esto se realizaron VC en donde se realizó un barrido de potencial de -0.3 V a 0.6 V a una velocidad de barrido de $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ PBS con un pH de 5.6, donde se realizaron dos ciclos para cada adición de lactato. Se realizaron 2 adiciones de 5 mM para llegar a 10 mM y posteriormente se realizaron adiciones de 10 mM hasta llegar a 50 mM. En la Figura 6.8 se puede observar una respuesta nerstiana de los electrodos con PB ante las adiciones de peróxido, en donde primero se ven los picos pertenecientes a la oxidación y reducción del hierro en el potencial de reducción de -0.3 V (Cinti et al., 2014) se ve un aumento de corriente catódica con forme se la adiciona el peróxido, a pesar de que estas son un tanto irregulares, muestran aún una tendencia a aumentar con respecto a la concentración en este potencial, esto es evidente haciendo las comparaciones de la corrientes para cada concentración de peróxido, por ejemplo para 0 mM la corriente en el pico de reducción está por debajo de $1 \mu\text{A}$, para 5 y 10 mM ronda los 3.2 y $4 \mu\text{A}$ respectivamente, mientras que para una concentración de 20 mM se muestra una corriente de $6.5 \mu\text{A}$ aproximadamente, a partir de una concentración de 30 mM se muestra una saturación ya que la corriente para las últimas 3 concentraciones se queda alrededor de los $8 \mu\text{A}$.

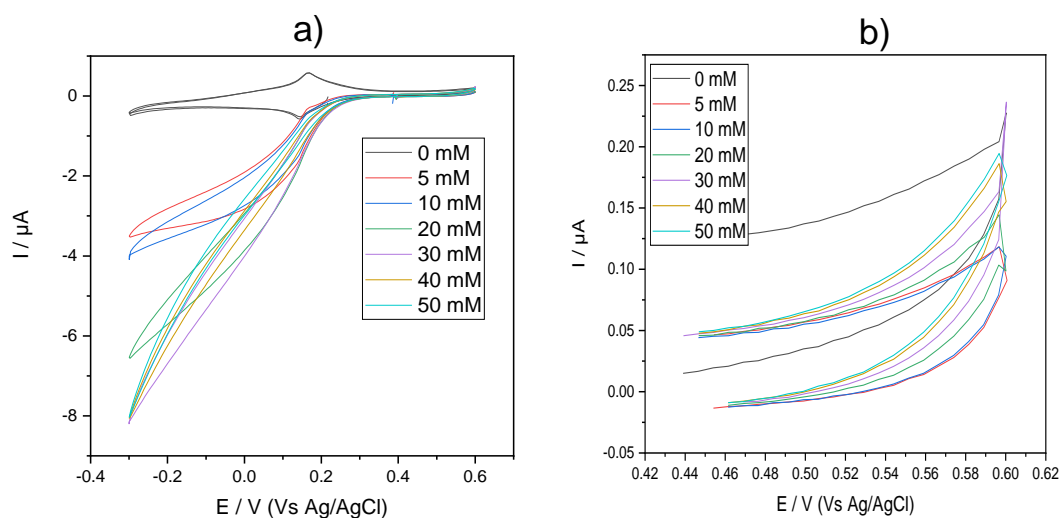


Figura 6.8. a) Voltamperometrías cíclicas de nanopartículas de PB a diferentes concentraciones de H_2O_2 en PBS pH 5.6 (0.1 M) a una velocidad de barrido de $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. b) Imagen ampliada del pico de oxidación de a) en un rango de 0.42 V a 0.62 V.

En el caso de este material ya se ha reportado en la literatura el desarrollo de biosensores enzimáticos de lactato por medio de peróxido de hidrógeno (SS & VA, 2016), sin embargo, en el caso de este trabajo no se tiene la presencia de albúmina de suero bovino en la mezcla enzimática y se hace a un pH más ácido (pH 5.6). En la Figura 6.9 se puede ver como el electrodo que contiene el PB y la enzima LOx responde tanto en un pico de oxidación como en un pico de reducción a la presencia de lactato en el medio. Aunque la respuesta a de la corriente depende de las adiciones de lactato, es decir tanto la corriente de oxidación como la de reducción aumenta con cada adición, puede observarse que la forma observada en las VC cambia con respecto a las adiciones de peróxido ya que en este caso se ve que al agregar el peróxido los picos de reducción y oxidación cambian, el de reducción aumenta considerablemente mientras que el de oxidación disminuye hasta hacerse imperceptible en esta escala, mientras que con las adiciones de lactato los cambios en el potencial de oxidación sí son perceptibles.

Sin embargo, hay que notar que el rango de corriente del electrodo de PB/LOx es aproximadamente 6 veces menor al rango visto en la Figura 6.8 y si se hace un acercamiento a la parte de oxidación como se muestra en la Figura 6.8 b) puede observarse que también aumenta la corriente en la oxidación, sin embargo, es de menor proporción que en el caso del electrodo con la enzima LOx mostrada en la Figura 6.9. Entonces la diferencia de las VC de los electrodos con y sin LOx nos sugiere que la interacción de la enzima con PB es el causante de esta diferencia notable en la forma y corrientes de las VC.

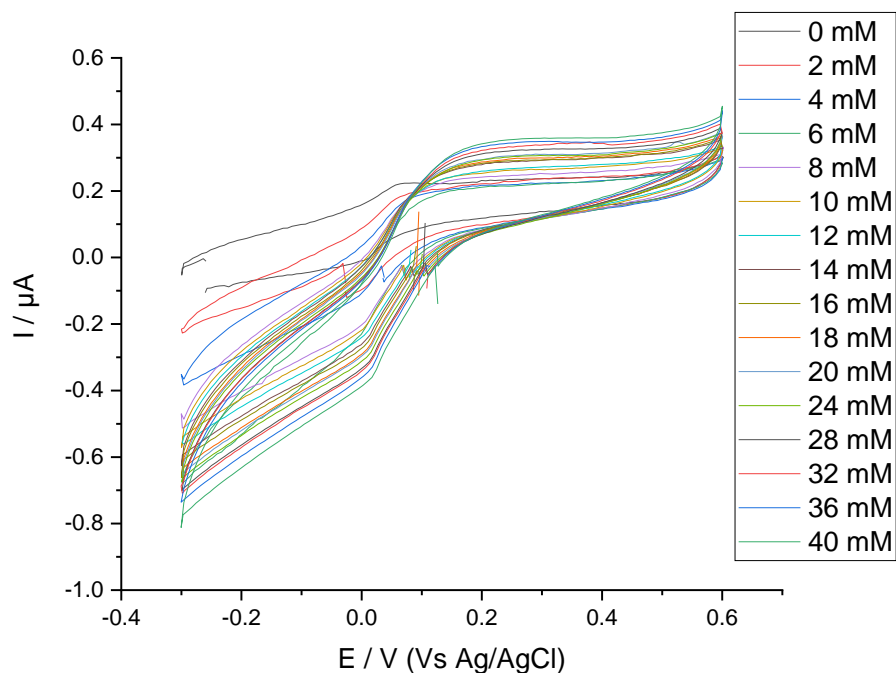


Figura 6.9. Voltamperometrías cíclicas de partículas de PB y LOx a diferentes concentraciones de Lactato en PBS pH 5.6 (0.1 M) a una velocidad de barrido de $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

De la misma manera, se realizó un triplicado de estos electrodos por medio de la técnica de voltamperometría cíclica Figura 6.10, debido a que resultó más sencillo observar la diferencia de corriente entre cada cambio de concentración mediante este método que mediante un método de cronoamperometría, (probablemente debido a un mecanismo parecido al observado en el ferricianuro de potasio debido a la similitud en su estructura y propiedades químicas), con la diferencia de que en este método se utilizó la corriente medida a un potencial de oxidación de 200 mV.

Para este caso se obtuvo un rango lineal de 8-40 mM ($R^2 = 0.958$), con la siguiente ecuación lineal $y = 2.05 \times 10^{-3}x + 0.26$, un límite de detección de 7.59 mM, un límite de cuantificación de 25.3 mM, constante de Michaelis-Menten de 2.51 mM, una sensibilidad de $2.05 \times 10^{-3} \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$, y una corriente máxima de 0.35 μA . Datos como el límite de detección y cuantificación nos dicen que el valor de la desviación estándar de los blancos es lo suficientemente grande para que sea poco viable hacer una medición de

lactato certera con un determinado electrodo elaborado por este método, pues la diferencia de corriente entre cada electrodo dada simplemente por sus diferencias físicas es mayor que la diferencia producida por algunas adiciones de lactato. Esto debido, probablemente, a la falta de afinidad entre el mediador, enzima y electrodo respectivamente. Por otro lado, cada electrodo muestra linealidades notables en rangos lo suficientemente amplios para pensar sensor el lactato en diversos fluidos fisiológicos como lágrimas, saliva o sangre.

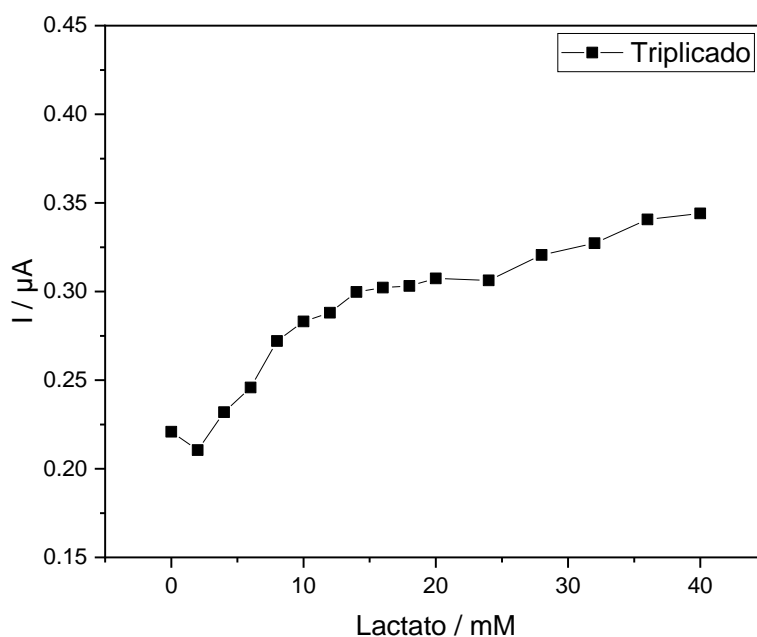


Figura 6.10 Triplicado de voltamperometrias cíclicas a 200 mV con electrodos de PB /LOx/EGDGE en PBS pH 5.6 (0.1 M) a una velocidad de barrido de 10 mV·s⁻¹.

Los datos de corriente máxima y constante de Lineweaver-Burk se obtuvieron mediante la gráfica mostrada en la Figura 6.11, que nos permite obtener los parámetros de la ecuación de Michaelis-Menten siguiendo los pasos que ya se han observado anteriormente. Cabe señalar que esta figura tiene una pendiente de 7.128 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$ y una ordenada al origen de 2.842 μA^{-1} con un $R^2 = 0.911$. La falta de linealidad podría ser debida a la poca afinidad entre el Papel Toray y el PB, ya que cuando se realizaron las pruebas electroquímicas se podía apreciar el desprendimiento del compuesto depositado sobre el electrodo al entrar al

contacto con la solución, el desprendimiento de una gran parte del material ocurre de inmediato mientras que el resto queda sobre la superficie del electrodo y se desprende más lentamente.

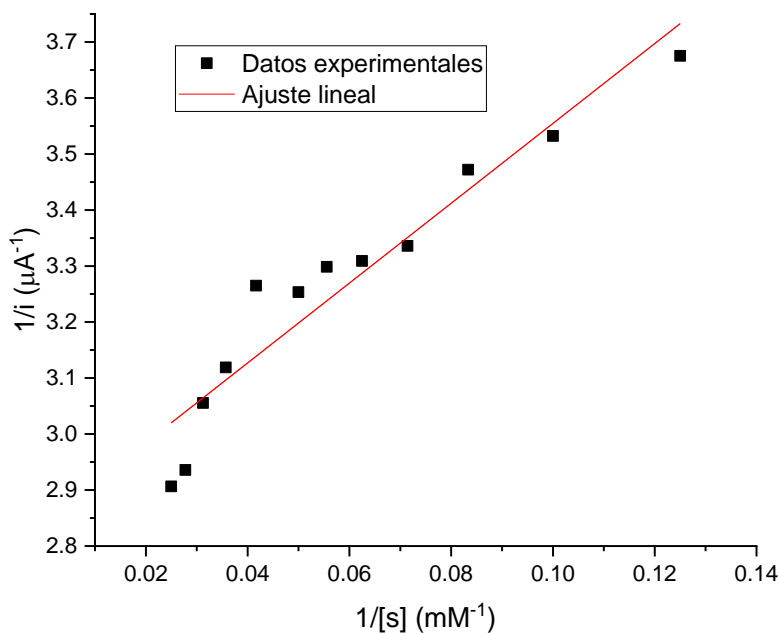


Figura 6.11 Gráfica y obtención de ordenada al origen y pendiente de la ecuación de Lineweaver-Burk aparente a partir de los datos experimentales.

En la Figura 6.12 Cronoamperometrías de electrodos PB/ LOx en buffer PBS pH 5.6, a diferentes concentraciones de Lactato en PBS pH 5.6 (0.1 M) en agitación continua. Figura 6.12 podemos ver una de las cronoamperometrías realizadas sobre los electrodos de Azul de Prusia y la enzima LOx a diferentes concentraciones de Lactato en PBS pH 5.6 (0.1 M) en agitación continua. Podemos observar que presenta una señal un tanto inestable y ruidosa, posiblemente a la resistencia causada por la enzima, en donde el cambio de corriente con respecto a las adiciones de lactato se ve considerablemente disminuido, hasta el punto en el que en la adición número 13 (8 mM de lactato) se empiezan a tornar indistinguibles los saltos de corriente aunque sigue habiendo una ligera tendencia de la corriente a disminuir, esto igual mente puede verse de manera más clara en la Figura 6.13

del duplicado graficado en concentración vs corriente, por lo que la siguiente imagen solo es el ejemplo para visualizar la forma que estas amperometrías tienen.

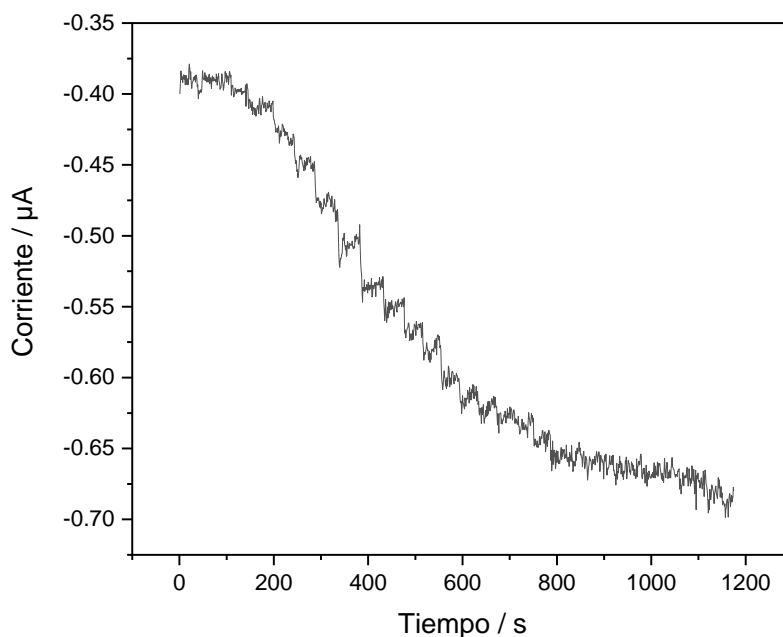


Figura 6.12 Cronoamperometrías de electrodos PB/ LOx en buffer PBS pH 5.6, a diferentes concentraciones de Lactato en PBS pH 5.6 (0.1 M) en agitación continua.

Mediante un duplicado de las pruebas cronoamperométricas realizadas puede observarse que el rango lineal de los electrodos disminuye un poco, ya que por encima de 10 mM parece alcanzarse la saturación del electrodo y ya no se ve un aumento de corriente, mientras que mediante VC, aunque cambia la pendiente en un rango de 0 - 8 mM con respecto al rango de 8 - 40 mM, sigue habiendo una relación entre la concentración de lactato y la corriente hasta 40 mM, es decir existen dos intervalos lineales. Mientras que por cronoamperometrías no puede observarse este segundo rango lineal, el rango completo en el que se hicieron las adiciones no muestra linealidad, pero muestra saturación, aparte de una dispersión de los datos considerable como puede observarse en la Figura 6.13. Es posible que, como para el caso del ferricianuro de potasio, este material requiera la aplicación de un potencial para que vuelva a su estado oxidado y pueda seguir oxidando al lactato.

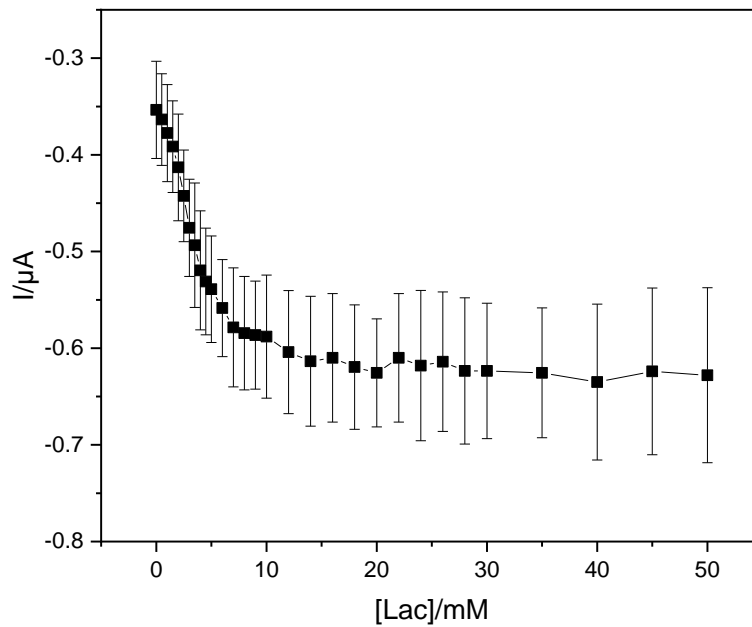


Figura 6.13 Duplicado de amperometrías de electrodos con PB y LOx.

Se realizaron posteriormente algunas pruebas de interferentes en una cronoamperometría adicionando 1 mM de lactato (Lac), 3 mM de glucosa (Glu), 0.1 mM de ácido úrico, 0.1 mM de Urea (U) y 0.2 nM de dopamina, estas adiciones se realizaron dos veces en este mismo orden. Como puede verse en la Figura 6.14 la respuesta del electrodo a las adiciones de lactato muestra un aumento notable en la corriente a aproximadamente $0.04 \mu\text{A}$ con la adición de lactato de 1 mM, las adiciones de glucosa también tuvieron una respuesta en el electrodo, pero esta vez con una disminución de la corriente, mientras que para los demás interferentes no se ve una respuesta notable. Por lo que podemos decir que tanto la dopamina como la urea no son interferentes de relevancia sin embargo la glucosa y el ácido úrico sí generan cambios en la corriente de una magnitud similar al lactato.

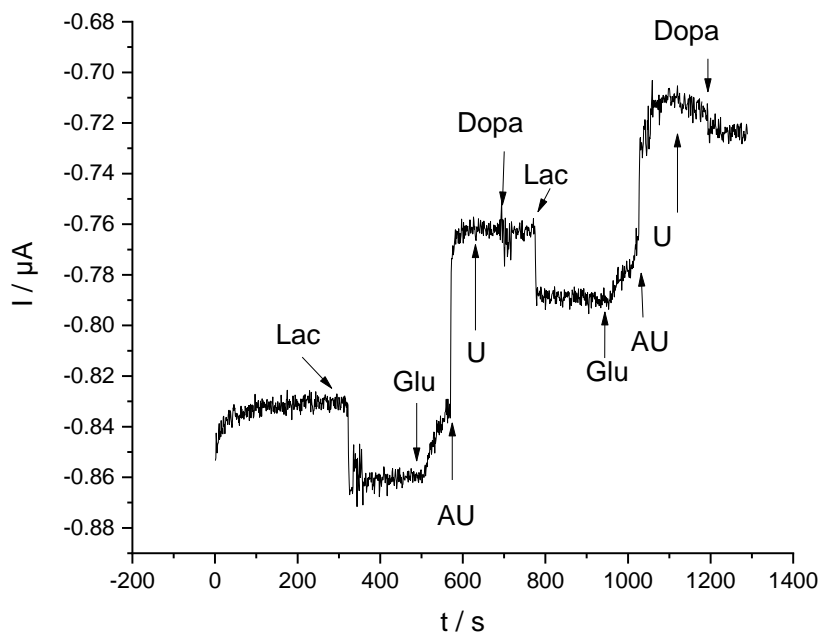


Figura 6.14. Prueba de interferentes de PB mediante cronamperometría en PBS pH 7.4 (0.1 M) a un potencial de -300 mV.

Para obtener algo de información acerca de la estructura del material, se realizó una microscopía electrónica de barrido y una prueba de dispersión de rayos X. En el caso de la microscopía se puede observar en la Figura 6.15, donde podemos ver que el tamaño promedio de las partículas sintetizadas es poco homogéneo y no rebasa los 1000 nm. Dejando ver que la dispersión no es del todo regular, con partículas más aglomeradas en distintas regiones pero siempre con tendencia a tener formas suaves redondeadas.

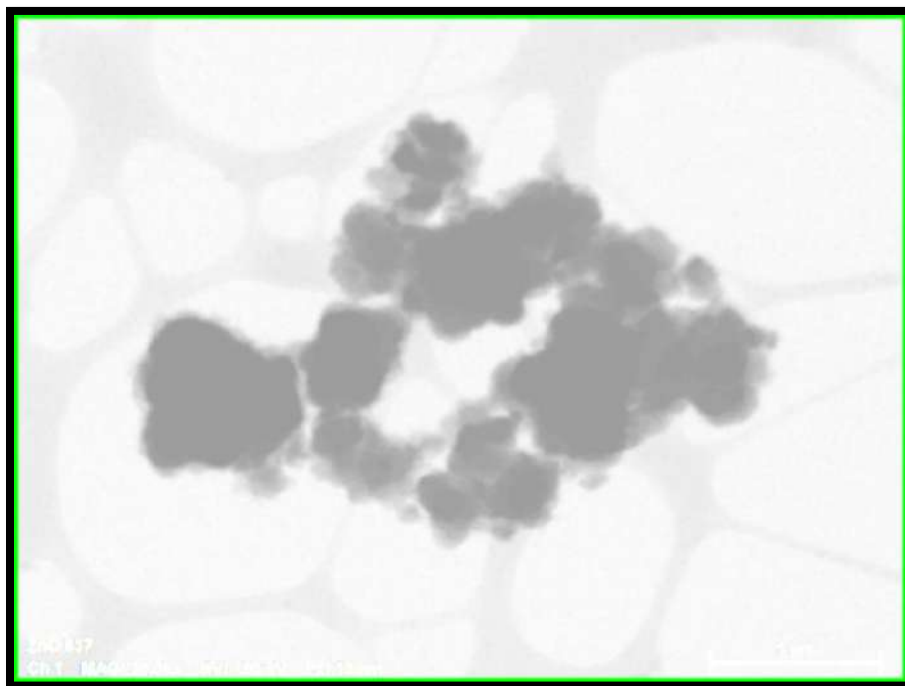


Figura 6.15 Microscopía electrónica de barrido de PB

En el caso del XRD y en comparación con espectros reportados en la literatura (Shiba et al., 2019), se identifican los picos pertenecientes a la estructura cristalina del azul de Prusia (JCPDS 70-2702), como puede verse en la Figura 6.16, pero aparte tenemos otros picos que, posiblemente, se deban a los distintos precursores y productos presentes en la reacción de formación del azul de Prusia, siendo importante resaltar que en este método se buscó que la elaboración de este material no se hiciera en medios ácidos, siendo este el medio que más favorece la reacción para formarlo, esto debido a que los pH's usados en metodologías probadas anteriormente (Ricci et al., 2003) mostraron tener un posible efecto inhibitorio sobre la enzima LOx.

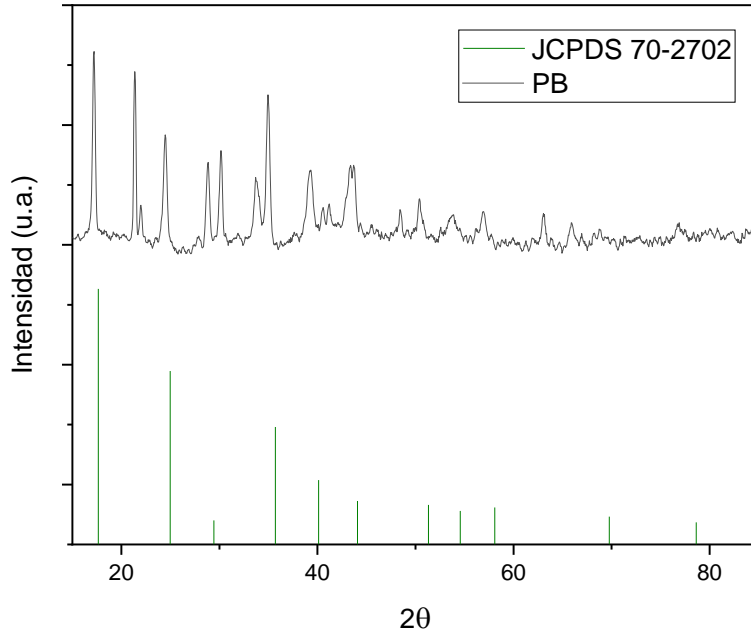


Figura 6.16 XRD de PB sintetizado.

Se calculó el tamaño del cristal por medio de la ecuación de Scherrer, y los datos obtenidos de los estudios realizados de XRD, se utilizaron los datos obtenidos de 11 picos significativos los cuales dieron los siguientes tamaños de cristalito correspondiente: 25.48 nm, 32.01 nm, 28.69 nm, 18.53 nm, 21.30 nm, 23.41 nm, 13.21 nm, 19.65 nm, 12.13 nm, 24.14 nm y 13.75 nm. Por lo que se obtuvo un tamaño promedio de 21.12 nm.

Para este método también se plantaron algunas modificaciones en la forma de inmovilización de manera similar al método con ferrocianuro de potasio se propuso depositar primero el PB y posteriormente adicionar la enzima sobre el PB que se dejó secando sobres los electrodos, sin embargo, en este caso esto no resultó en una mejor respuesta de la corriente frente a las adiciones de lactato pues la respuesta fue nula como puede observarse en la Figura 6.17. Esto puede ser debido a la poca afinidad del material con el electrodo, lo que produciría que la enzima se desprenda del electrodo junto con parte del PB de la superficie del electrodo dejando a la enzima solamente disuelta en la solución sin interacción con el electrodo.

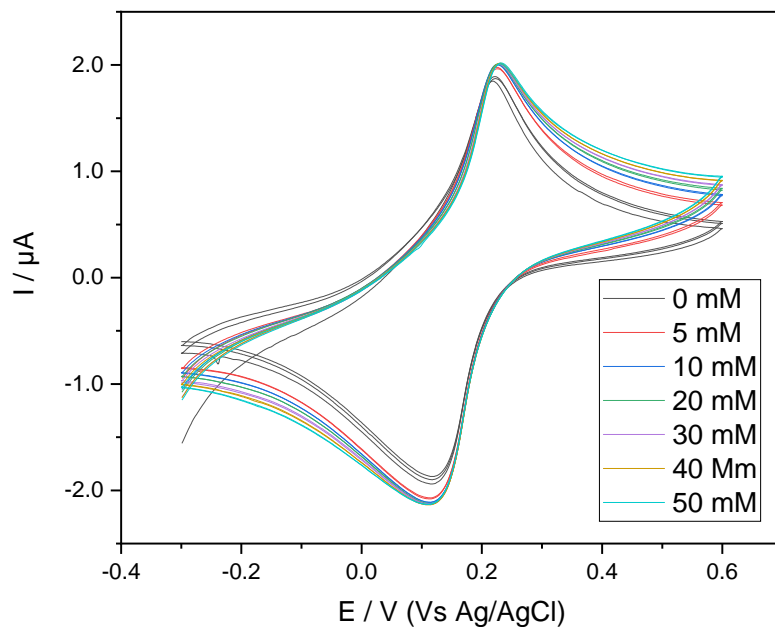


Figura 6.17 Voltamperometrías cíclicas de nanopartículas de PB y LOx método B a diferentes concentraciones de Lactato en PBS pH 5.6 (0.1 M) a una velocidad de barrido de $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

6.4 Evaluación de electrodos de Cu-Fe PBA

Este material se denomina un análogo del azul de Prusia (Guo et al., 2020) que se refiere a un material que tienen composiciones definidas de cationes metálicos, que actúan como nodos que están unidos por grupos de cianuro que actúan a su vez como puente (Jiao et al., 2017). En este caso esta estructura está conformada por cobre hierro y cianuro de manera similar a como se muestra en la siguiente imagen.

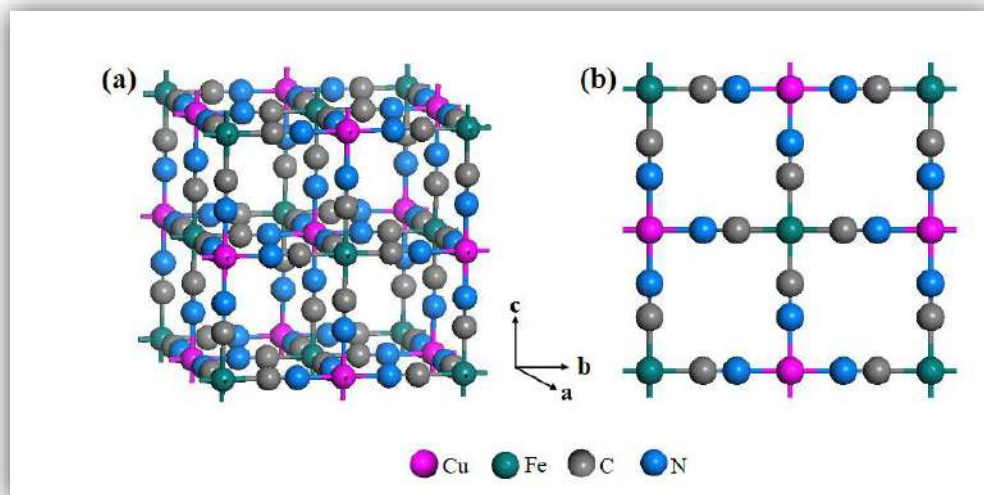


Figura 6.18 (a) La estructura de $\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ en tres sistemas de coordenadas (b) y plano bc (Jiao et al., 2017).

Este material se probó por medio de VC, amperometrías y Voltametría de pulso diferencial (DPV). Las VC fueron de ayuda para determinar a primera instancia el comportamiento de los electrodos a la presencia de lactato, Se realizaron en un rango de -0.4 a 0.6 V con una velocidad de barrido de $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, en PBS a un pH de 5.6 al igual que en la Figura 6.17. Esto mostró picos de oxidación notables ante la presencia de lactato cercano a 0.05V (vs Ag/AgCl) que corresponde al $\text{Fe}(\text{CN})_6$ del azul de prussia como se ha reportado por otros autores, además, se observan los valores de la corriente desde ligeramente negativos hasta valores cercanos a los $100 \mu\text{A}$ para el mismo potencial. Un cambio también notable se puede ver en la parte de reducción, que aunque no muestra picos bien definidos a un potencial es evidente para cada concentración de lactato que la corriente aumenta y lo hace esta vez de manera correspondiente con cada adición a un potencial de -0.3 V como se muestra en la Figura 6.19.

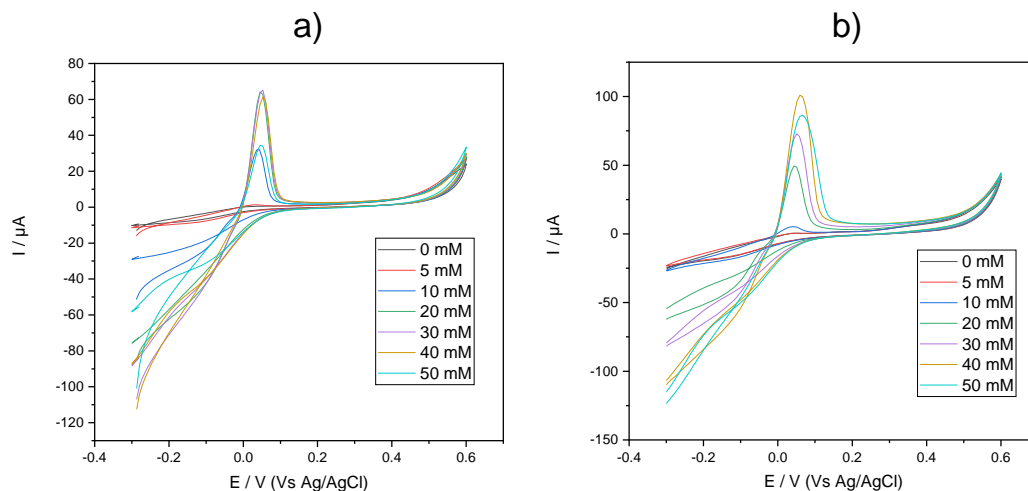


Figura 6.19 Voltamperometrías cíclicas de partículas de a) Cu-Fe PBA y b) Cu-Fe PBA y LOx a diferentes concentraciones de Lactato en PBS pH 5.6 (0.1 M) a una velocidad de barrido de $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Posterior a esta prueba se realizaron otras VC que muestran que este mismo comportamiento se presenta cuando la enzima no es colocada sobre el electrodo, lo que nos hace concluir que el efecto visto es producido por el material únicamente. Cabe mencionar que los resultados son algo dispersos y rara vez se logró observar esta dependencia con la concentración de lactato hasta valores de 50 mM por lo que se optó por utilizar técnicas de DPV con el objetivo de observar de mejor manera estos picos de oxidación mostrados en el material. Estas pruebas fueron realizadas de un potencial inicial de -0.3 V a un potencial de 0.4 V , teniendo como parámetros una amplitud de 10 mV , un ancho de pulso de 100 ms , un incremento de potencial de 2 mV y un tiempo de muestreo de 300 ms . Estas pruebas nos ayudaron a establecer de manera certera que la mayoría de los electrodos tenían como punto de saturación una concentración menor a la que suponíamos de 8 mM como es notable en la Figura 6.20.

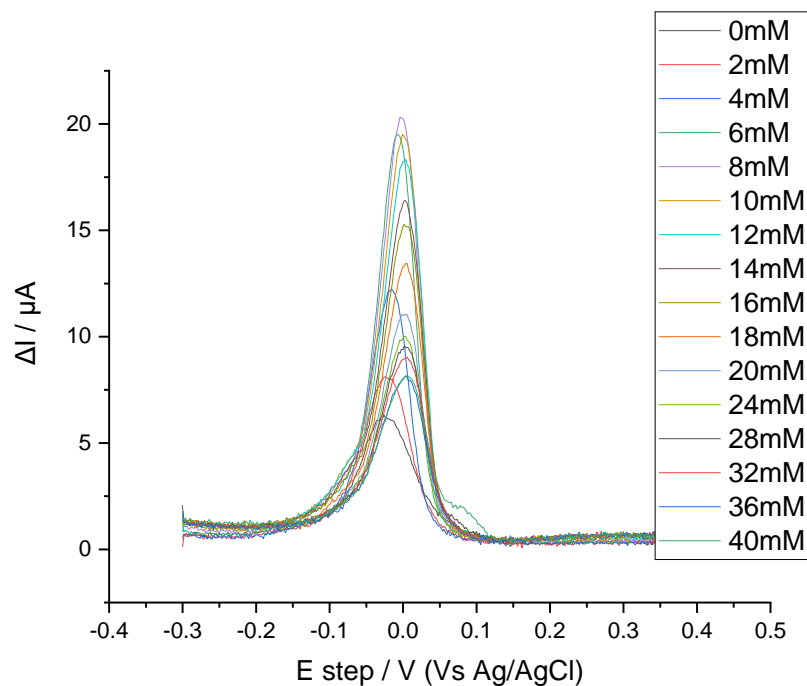


Figura 6.20 Voltametría de pulso diferencial de CuFe-PBA a diferentes concentraciones de lactato en PBS pH 5.6 (0.1 M).

En la Figura 6.21 podemos ver de manera más clara la relación entre el aumento de la corriente y las distintas concentraciones de lactato, podemos ver que alcanza la corriente más alta a una concentración de apenas 8 mM lo que concuerda con lo visto en algunas VC vistas anteriormente. La Figura 6.21 a) muestra la corriente del electrodo en un rango de concentraciones desde 0 a 40 mM mientras que en la parte b) solo se muestra hasta 8 mM, aquí se puede apreciar mejor que hasta esta concentración aún se muestra un rango diamico.

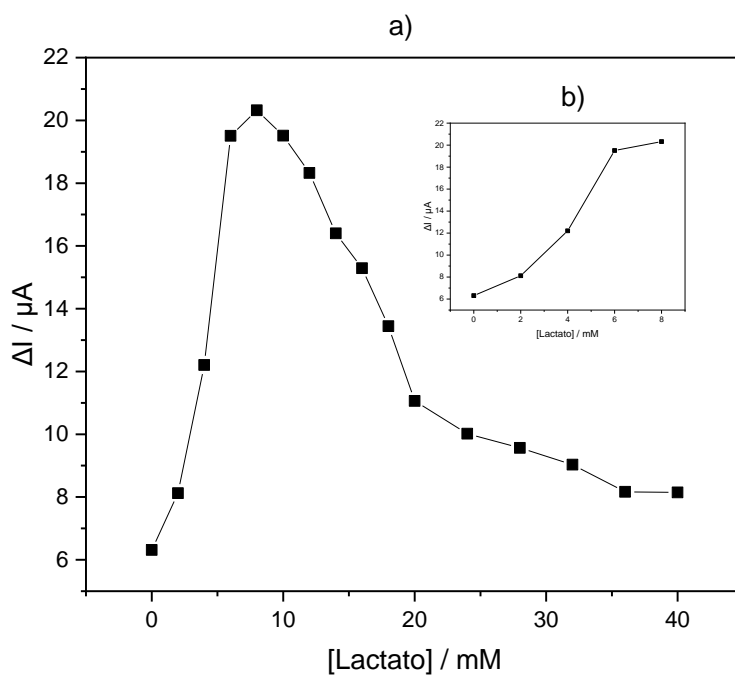


Figura 6.21 a) Concentración de lactato vs diferencia de corriente obtenida de la Voltametría de pulso diferencial de CuFe-PBA con LOx a diferentes concentraciones de lactato en PBS pH 5.6 (0.1 M) b) Concentración de lactato vs diferencia de corriente obtenida de la Voltametría de pulso diferencial de CuFe-PBA con LOx a diferentes concentraciones de lactato on un rango de 0 a 8 mM.

Se realizó un duplicado de la prueba anterior de DPV de donde se obtuvo rango lineal de 0-8 mM ($R^2 = 0.958$), un límite de detección de 1.569 mM, un límite de cuantificación de 5.23 mM, constante de Michaelis-Menten aparente de 42.83 mM, una sensibilidad de $2.25 \mu A \cdot mM^{-1}$, y una corriente máxima de $138.89 \mu A$, cabe resaltar que en este caso no se colocó enzima sobre los electrodos, por lo que el significado usual de K_m como afinidad de la enzima por el substrato no tendría sentido. Sin embargo, por la forma de las gráficas obtenidas aún podemos obtener valores representativos de estos parámetros. En este caso el límite de detección toma valores que nos permiten la detección del lactato en el medio, sin embargo el límite de cuantificación se acerca bastante al rango lineal del electrodo, por lo que la cuantificación puede ser poco efectiva. Esto debido probablemente a la poca regular dispersión de las partículas sobre el electrodo.

Este material fue evaluado posteriormente por cronoamperometría, considerando el hecho que presenta una saturación a los 8 mM que puede ser útil para evaluarlos en fluidos biológicos como lágrimas, sudor o sangre por lo que estas se realizaron en condiciones que coincidan mejor con estos medios ya que estos tienen un pH neutro y como concentración máxima de lactato pueden contener alrededor de 6 mM. Realizando adiciones de lactato cada sesenta segundos en distintos rangos de concentración de lactato. De 0 a 1.6 mM se hicieron 16 adiciones de 0.1mM, de 1.6 a 3.6 mM se hicieron 10 adiciones de 0.2mM y finalmente de 3.6 a 6 se realizaron 6 adiciones de 0.4 mM. En la figura 6.22 pueden observarse estos 3 rangos de adiciones que comienzan alrededor de los 380 segundos.

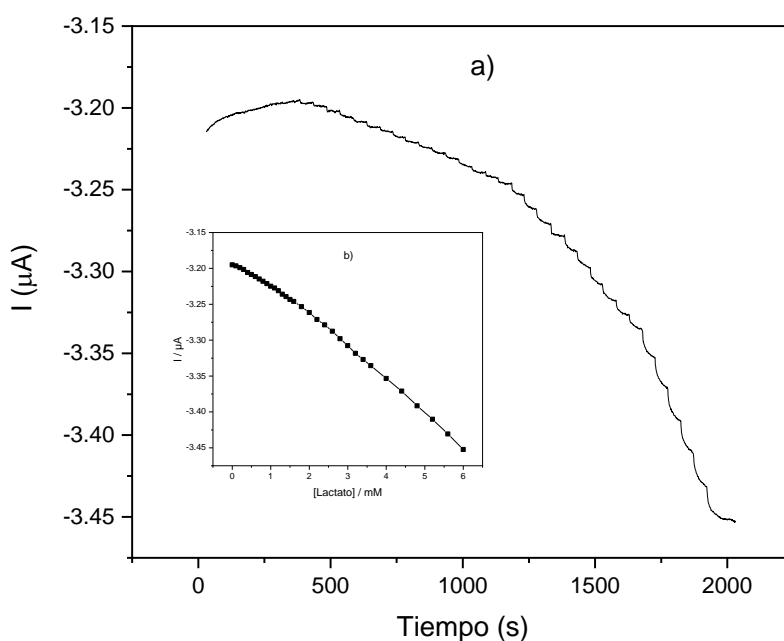


Figura 6.22 a) Cronoamperometría de FeCu NP's a con adiciones de ácido láctico en PBS pH 7.4 (0.1 M) a un potencial de -300mV b) corriente en función de la concentración de lactato.

Se realizó un triplicado de estas pruebas de cronoamperometría y se obtuvo un rango lineal de 0 mM a 6 mM con una $R^2 = 0.976$ y la siguiente ecuación lineal $y = -5.14 \times 10^{-2}x - 3.2$. El desconocimiento del mecanismo redox que sucede en este electrodo llevó

a la pregunta de si este tiene alguna dependencia de oxígeno, para lo cual podemos plantear al siguiente experimento que trata de hacer una cronoamperometría a en la que, posterior a una adición, nitrogenamos el medio, esperando ver una disminución de la corriente y posteriormente oxigenamos el medio, esperando ver un aumento notable en la corriente por arriba de donde se encontraba antes de nitrogenar justo como se muestra en la Figura 6.23. Los parámetros de este experimento son las mismas que en la Figura 6.22.

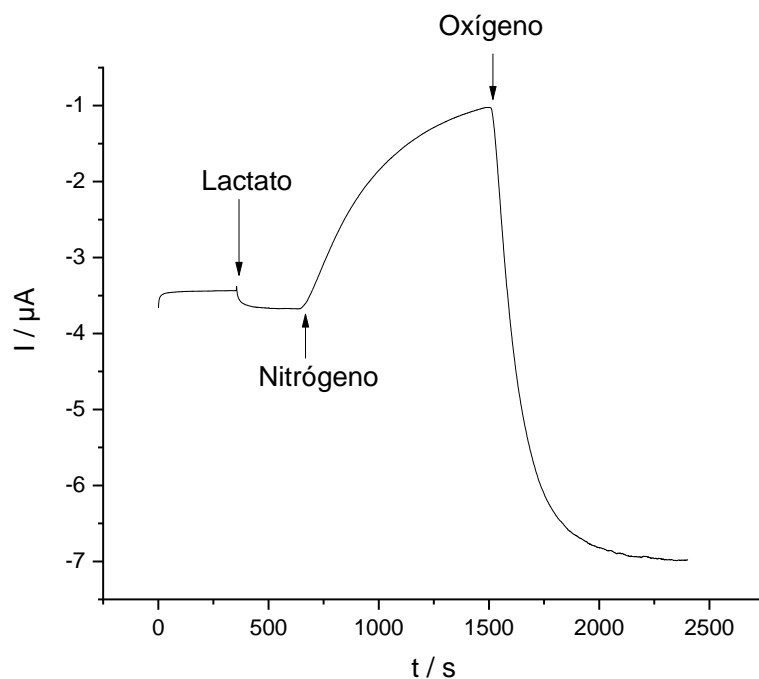


Figura 6.23 Efecto de la nitrogenación y oxidación en el electrodo de CuFe-PBA.

En este caso se hizo una prueba de interferentes con 1 mM de lactato (Lac), 3 mM de glucosa (Glu), 0.1 mM de ácido ascórbico (AA), 0.1 mM de ácido úrico (AU), 0.1 mM de Urea (U) y 0.2 nM de dopamina. En la Figura 6.24 podemos ver que solamente la adición de lactato produce un aumento de la corriente en el sentido negativo, todas los demás interferentes probados causan el efecto contrario, de disminución de la corriente, cada uno con una magnitud distinta siendo la dopamina la que tuvo el efecto menos notorio, casi imperceptible y el ácido úrico y el ácido ascórbico los que causaron un mayor cambio en la corriente, en el caso de la primera adición de ácido ascórbico se vio un cambio de 0.9 μ A, mucho mayor que los cambios de corriente vistos anteriormente para las adiciones de

lactato, con lo que no sería posible medir de manera precisa la concentración de lactato presente en la solución en la presencia de alguno de estos interferentes, en otras palabras se puede decir que el material no es selectivo sino que más bien pueda catalizar reacciones redox de distintos materiales orgánicos.

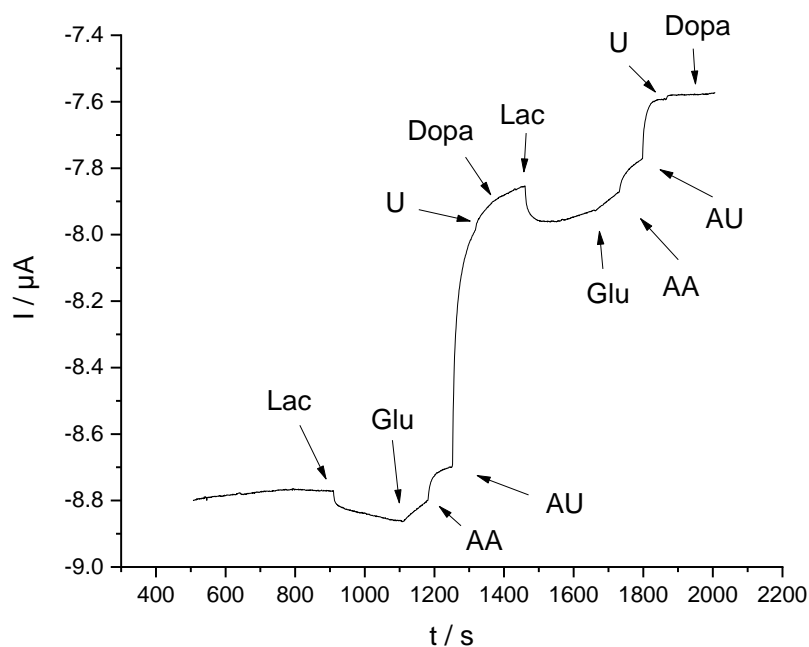


Figura 6.24 Prueba de interferentes de CuFe-PBA.

Para este material igualmente se realizó una microscopía electrónica de barrido y una prueba de dispersión de rayos X de la misma manera que para el PB. En el caso de la microscopía se puede observar en la Figura 6.24, donde podemos ver que el tamaño promedio de las partículas sintetizadas está alrededor de los 2 μm . Con aglomeración no homogénea en distintas partes de la imagen mostrada, esto concuerda con lo visto durante el manejo de este material ya que era más difícil obtener una suspensión homogénea con este material, lo que posteriormente ocasionaba que al depositar sobre las superficies de los electrodos su dispersión fuera poco homogénea.

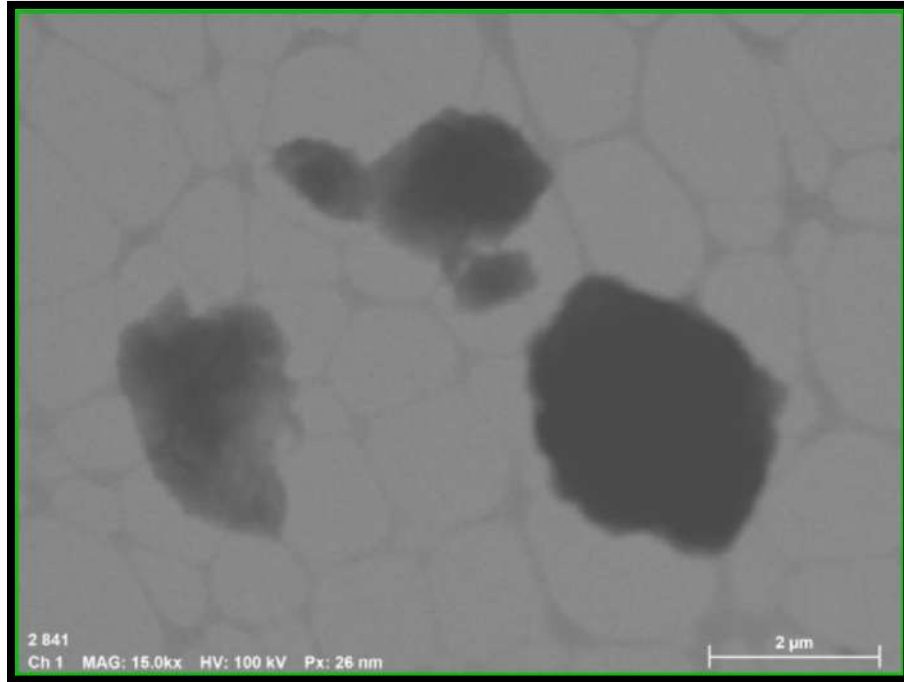


Figura 6.25 Microscopía electrónica de barrido de CuFe-PBA.

En el caso del XRD para este material podemos observar prácticamente la misma estructura cristalina que la reportada en la literatura para el azul de Prusia en la Figura 6.25 (Shiba et al., 2019), lo que es el objetivo al sintetizar este material, pues de ahí su nombre de análogo al azul de Prusia (PBA), pues replica su estructura cristalina a partir de distintos precursores que dan como resultado la estructura cristalina del PB pero con átomos de cobre como cationes donde antes teníamos hierro para formar la unión iónica con el ferricianuro, tal y como se muestra en la Figura 6.18.

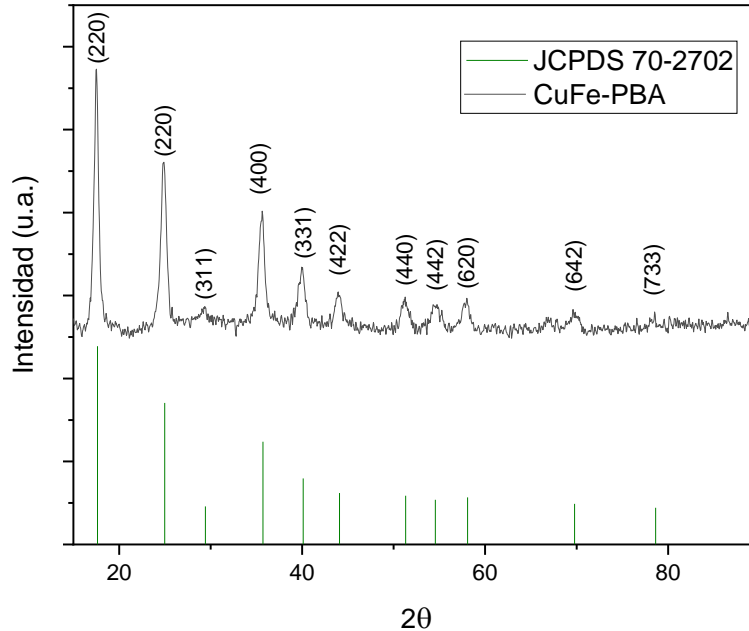


Figura 6.26 XRD de CuFe-PBA sintetizado.

Se calculó el tamaño del cristal por medio de la ecuación de Scherrer, y los datos obtenidos de los estudios realizados de XRD, se utilizaron los datos obtenidos de 11 picos significativos los cuales dieron los siguientes tamaños de cristalito correspondiente: 13.79 nm, 11.49 nm, 11.37 nm, 9.74 nm, 9.09 nm, 8.81 nm, 7.31 nm, 10.46 nm, 8.97 nm, 39.42 nm, 6.12 nm. Por lo que se obtuvo un tamaño promedio de 12.42 nm.

6.5 Comparación de resultados

En la Tabla 6-1 se muestra un resumen de algunos parámetros de los electrodos más relevantes usados para la detección de lactato en este trabajo. Podemos observar que el electrodo que logró una mejor linealidad y un rango más amplio es el electrodo con LOx y ferricianuro de potasio, sin embargo, también es uno de los dos electrodos que mayor desviación estándar tiene entre sus datos. El electrodo que tiene más desviación estándar considerando los datos tomados del triplicado es el electrodo de FeCu-PBA probado mediante métodos amperométricos a un pH de 7.4, sin embargo cabe mencionar que el tiempo dedicado a su desarrollo y evaluación es considerablemente diferente, ya que para el

desarrollo de los electrodos de $K_3[Fe(CN)_6]$ -LOx se trabajó el mismo tiempo que para el desarrollo de todos los demás métodos juntos realizados en este trabajo, es decir su desarrollo fue más prolongada y su evaluación más exhaustiva.

Tabla 6-1 Comparación de resultados de este trabajo

Material	Rango lineal	LQ / mM	LD /mM	Km / mM	Jmax/ μA	Potencial/V	pH	Agitación	Sensibilidad / mM $\cdot\mu A^{-1}$
$K_3[Fe(CN)_6]$-LOx (VC)	0-50 mM $R^2 = 0.996$	14.4	4.5	19.8	0.196	0.3	7.4	No	2.08E-03
FeCu-PBA (Amp)	0-6 mM $R^2 = 0.983$	2.895	0.87	NA	NA	-0.3	7.4	Sí	-5.14E-02
FeCu-PBA* (DPV)	0-8 mM $R^2 = 0.956$	5.231	1.569	NA	NA	0.01	5.6	No	
PB-LOx (VC)	8-40 mM $R^2 = 0.958$	25.4	7.59	2.5081	0.35	0.2	5.6	No	2.05E-03

* = Solo se tiene duplicado

Tabla 6-2 Resultados reportados en la literatura.

Material	Rango lineal	LD /mM	Tipo de transducción	Sensibilidad / mM $\cdot\mu A^{-1}$	Referencia
MTEOS/Os-polymer/GCE/LOx	0.1 – 9 mM	0.05 mM	Amperometrica	1.02 mA \cdot mM $^{-1}$	(Park et al., 1997)
Película de PPY dopada con polianión/electrodo de Pt/LOx	0-30mM	5 mM	Amperometrica	5 μA \cdot Mm $^{-1}$	(Khan & Wernet, 1997)
LOx/HRP	5-40 mM	10 mM	Amperometrica	0.27 nA \cdot mM $^{-1}$	(Ghamouss et al., 2006)
$K_3[Fe(CN)_6]$/LOx	1-50 mM	1 mM	Amperometrica	NE	(Sato & Okuma, 2006)
PB/LOx	1-50 mM		Amperometrica	NE	(SS & VA, 2016)

6.6 Desarrollo de la biocelda de combustible

Los electrodos usados fueron un ánodo que contenga o no nuestra enzima y su mediador electroquímico o el material abiótico, mientras que el biocátodo fue derivado de la enzima lacasa unida a nanotubos de carbono multipared sin modificación y modificados con antraceno o pireno-antraceno (R.A. Escalona-Villalpando et al., 2017), los experimentos se llevaron a cabo sin agitación en una solución de PBS 0.1 M con un pH 5.6 en un solo compartimento. Para determinar el funcionamiento de la biocelda se hicieron curvas de descarga lineales desde potencial a circuito abierto a V con un barrido de 10 mV·s. Los resultados de estas pruebas mostraron también dispersión en los datos para los distintos electrodos probados.

El primer material probado fue el PB con LOx, el cual mostró, aparte de bastante dispersión, poca reacción ante las adiciones de lactato, es probable que en caso de existir algún aumento de corriente o de potencial debida a la adición de lactato esta fuera más difícil de ver debido que la señal obtenida era sumamente ruidosa, Por lo que en los datos obtenidos no puede apreciarse una tendencia clara ni patrones que nos permitan describir algún proceso relevante.

Posterior a esto se evaluó el comportamiento de la celda de combustible usando el material abiótico FeCu-PBA mediante el mismo experimento con los mismos parámetros. En este caso los resultados fueron un poco más homogéneos, con dispersión aún pero mostrando una tendencia a aumentar tanto en corriente como en su potencial a circuito abierto, como puede verse en la Figura 6.27, los cambios en la corriente fueron de 0.17 μ A y el potencial a circuito abierto de 15 mV aproximadamente para para la última adición de lactato, también puede observarse que aunque el cambio de concentración aumenta cada 2 adiciones la corriente y el potencial cada vez aumenta menos, por lo que no se ve un aumento lineal y posiblemente el sistema esté cerca de la saturación. El resultado es interesante porque se observa un aumento en el OCP, corriente y potencia con el aumento de la concentración de lactato, lo que pudiera funcionar como sensor autoalimentado, ósea una celda de combustible que pudiera servir como sensor de lactato.

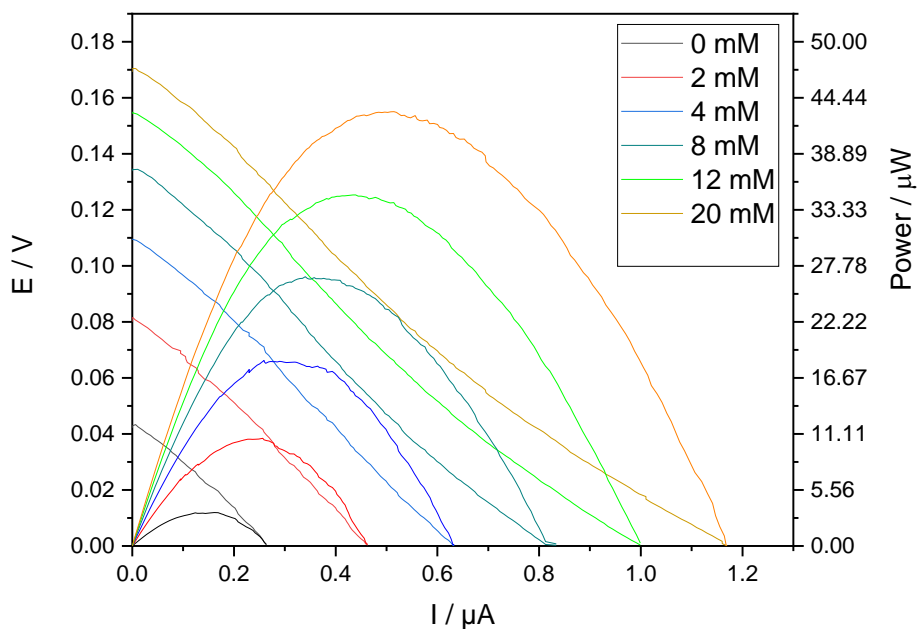


Figura 6.27 Curvas de descarga de celda de combustible y efecto de las concentraciones de lactato sobre el rendimiento de la celda con ánodo de Cu-Fe PBA y cátodo de Lacasa/MWCNT a distintas concentraciones de lactato en PBS pH 5.6, a una polarización de $2 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

En la Figura 6.27 puede observarse la gráfica de potencia vs corriente obtenida de los datos del funcionamiento de la celda mediante la multiplicación de la corriente y el potencial según la ley de Watt. Obteniendo así una potencia máxima de $43.3 \mu\text{W}$ o $481 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^2$ teniendo en cuenta que la superficie de nuestro electrodo es de 3 mm por 3 mm, lo cual puede considerarse una buena producción de energía en comparación con otros sistemas reportados en la literatura (R A Escalona-Villalpando et al., 2019).

7 Conclusiones

En la evaluación de distintos métodos de inmovilización se destacaron los métodos descritos en 6.1, donde se usó ferricianuro de potasio como mediador electroquímico y agar como agente entrecruzante y el método descrito en 6.3, con PB como mediador y EGDEG como agente entrecruzante. Ambos junto con la enzima Lactato Oxidasa (LOx). Con el ferricianuro de potasio se obtuvieron rangos lineales desde 0 a 50 mM con una $R^2 = 0.999$,

esto en PBS 0.1 M con un pH de 7.4 a un potencial de 300 mV, sin embargo, se observó alta dispersión en los datos y desprendimiento del material depositado sobre los electrodos al contacto con el PBS.

Los electrodos con Azul de Prusia (PB) arrojaron un rango lineal de 8 a 40 mM con una $R^2 = 0.958$ en PBS 0.1 M con un pH de 5.6 a un potencial de 200 mV. También mostraron una alta dispersión, posterior a esto el resto de las pruebas se enfocaron más en este último método, ya que no presentó desprendimientos significativos del material depositado. En la búsqueda de diferentes métodos de inmovilización se encontraron los descritos en 6.2 y 6.4, ambos son métodos que mostraron potencial para la oxidación de lactato sin uso de ninguna enzima, en el caso del 6.2 se demostró que era debido a que el potencial aplicado sobre el sistema producía la electro oxidación del lactato. Mientras que el método 6.4 que fueron electrodos preparados con partículas de Cu-Fe PBA sí mostró actividad para la reducción y oxidación de lactato. En un pH de 7.4 se observó un rango dinámico de 0 a 50 mM y las pruebas se hicieron en un rango de 0 a 6 mM. Obteniendo una $R^2 = 0.983$ en PBS 0.1 M a un potencial de -300 mV.

En el caso del PB y el material CuFe-PBA se lograron caracterizar por diferentes técnicas obteniendo información cristalográfica mediante XRD, morfológica por TEM y de composición mediante XRF, muestran una gran similitud en su estructura cristalina con las estructuras propias de estos materiales reportadas en la literatura y mostrando composiciones acordes a lo que se esperaba obtener, aunque por otro lado se esperaba obtener tamaños de partículas bastante más pequeños, en la escala nanométrica, mientras que los tamaños obtenidos rondan 1 o 2 μm de diámetro.

La evaluación a diferentes pH's de las partículas de CuFe-PBA muestran rangos lineales significativamente más grandes, pues mientras que a un pH de 5.6 el rango lineal no pasa de 8 mM para un pH más neutro de 7.4 este rango supera los 50 mM, esto nos da información acerca de los posibles mecanismos mediante los cuales sucede la oxidación y la reducción de lactato en la presencia de este material, lo cual posiblemente pueda darse por medio de radicales libres. Además se pudo observar en este mismo material que dicha reacción está mediada por oxígeno pues al desplazar el oxígeno con nitrógeno, las corrientes disminuyen drásticamente y al oxigenar nuevamente el medio, se observa un

aumento notable en la corriente. Este material es novedoso y no se ha reportado para la oxidación de lactato, por lo que fue un logro en el trabajo.

8 Perspectivas

Se realizaron distintas pruebas electroquímicas para cada uno de los materiales probados en este trabajo, sin embargo un proceso de optimización de los electrodos aún es requerido para el posterior desarrollo de sensores en base a cualquiera de los materiales antes vistos, pues si bien algunos métodos como el DPV mostrado en este trabajo parece mostrar algunas mejorías con respecto a la reproducibilidad y dispersión de los datos, esta tendencia no se sigue para todos los métodos realizados en este trabajo. Sin embargo, aspectos como cambiar los sustratos en los cuales son depositados los materiales de interés, así como utilizar métodos de deposición más controlados puede ayudar a mejorar estos aspectos significativamente.

Otro punto sumamente interesante es continuar con las evaluaciones del comportamiento de estos materiales en electrodos para celdas de combustible, ya que aunque los materiales mostraron problemas en pruebas de interferentes estos problemas pueden no ser significantes si lo que se busca es generar energía, en lugar de obtener información cuantitativa. Con lo que el CuFe-PBA muestra un potencial interesante en esta área, así como también en posibles aplicaciones en proceso avanzados de oxidación.

9 Referencias

- Allen J. Bard and Larry R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, New York: Wiley, 2001, 2nd ed. (2002). *Russian Journal of Electrochemistry*, 38(12), 1364–1365. <https://doi.org/10.1023/A:1021637209564>
- Amor Gutiérrez, O. (2015). *Sensor enzimático de papel*.
- Cano Luna, M. (2009). *Diseño y aplicación de sensores electroquímicos basados en moléculas orgánicas conductoras*. Universidad de Córdoba, Servicio de Publicaciones.
- Cinti, S., Arduini, F., Moscone, D., Palleschi, G., & Killard, A. J. (2014). Development of a hydrogen peroxide sensor based on screen-printed

- electrodes modified with inkjet-printed Prussian blue nanoparticles. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 14(8), 14222–14234. <https://doi.org/10.3390/s140814222>
- Cortón, E. (2000). *Desarrollo y aplicaciones de biosensores enzimáticos y microbianos*. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- DECTOR, D. (2016). Caracterización electroquímica de electrodos enzimáticos con lactato oxidasa y bilirrubina oxidasa para su implementación en celdas de combustible. *CENTRO*.
- Escalona-Villalpando, R.A., Reid, R. C., Milton, R. D., Arriaga, L. G., Minteer, 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, Ortiz-Ortega, E., Bocanegra-Ugalde, J. P., Minteer, S. D., Ledesma-García, J., & Arriaga, L. G. (2019). Clean energy from human sweat using an enzymatic patch. *Journal of Power Sources*, 412, 496–504.
- Escalona-Villalpando, Ricardo A, Reid, R. C., Milton, R. D., Arriaga, L. G., Minteer, S. D., & Ledesma-García, J. (2017). Improving the performance of lactate/oxygen biofuel cells using a microfluidic design. *Journal of Power Sources*, 342, 546–552.
- Flores, E. (1995). Voltametría cíclica: la espectroscopía electroquímica. Parte I. *Revista de Química*, 9(2), 165–172.
- Gatti, P. S. (n.d.). *Electrodos para medir Glucosa (Junio 2004)*.
- Ghamouss, F., Ledru, S., Ruillé, N., Lantier, F., & Boujtita, M. (2006). Bulk-modified modified screen-printing carbon electrodes with both lactate oxidase (LOD) and horseradish peroxidase (HRP) for the determination of l-lactate in flow injection analysis mode. *Analytica Chimica Acta*, 570(2), 158–164. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.04.022>
- Guo, R., Chen, Y., Nengzi, L., Meng, L., Song, Q., Gou, J., & Cheng, X. (2020). In situ preparation of carbon-based Cu-Fe oxide nanoparticles from CuFe Prussian blue analogues for the photo-assisted heterogeneous peroxydisulfate activation process to remove lomefloxacin. *Chemical Engineering Journal*, 398, 125556. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125556>
- Habermüller, K., Mosbach, M., & Schuhmann, W. (2000). Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366(6–7), 560–568.
- Haghighi, B., Hamidi, H., & Gorton, L. (2010). Electrochemical behavior and application of Prussian blue nanoparticle modified graphite electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 147(1), 270–276.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.03.020>

- Hao, C., Shen, Y., Wang, Z., Wang, X., Feng, F., Ge, C., Zhao, Y., & Wang, K. (2016). Preparation and Characterization of Fe₂O₃ Nanoparticles by Solid-Phase Method and Its Hydrogen Peroxide Sensing Properties. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(3), 1069–1077. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b01150>
- Ibrahim, M. M. R., & Levine, P. M. (2014). CMOS transimpedance amplifier for biosensor signal acquisition. *2014 IEEE International Symposium on Circuits and Systems (ISCAS)*, 25–28. <https://doi.org/10.1109/ISCAS.2014.6865056>
- Jiao, S., Tuo, J., Xie, H., Cai, Z., Wang, S., & Zhu, J. (2017). The electrochemical performance of Cu₃[Fe(CN)₆]₂ as a cathode material for sodium-ion batteries. *Materials Research Bulletin*, 86, 194–200. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2016.10.019>
- JIMÉNEZ C, C., & LEÓN P, D. E. (2009). Biosensores: aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios . In *Vitae* (Vol. 16, pp. 144–154). scieloco .
- JIMÉNEZ C, C., LEÓN P, D. E., Russo, C. C., Sarobe, M., Alonso, N., Álvarez, E., Charne, J., Di Cicco, C., Jaszczyszyn, A., Jatip, N., Llanos, E., Luengo, P., Vizcaya Antolín, D., Escalona-Villalpando, R. A., Ortiz-Ortega, E., Bocanegra-Ugalde, J. P., Minteer, S. D., Ledesma-García, J., Arriaga, L. G., ... Gil, E. J. P. (2009). Diseño y aplicación de sensores electroquímicos basados en moléculas orgánicas conductoras. *Journal of Power Sources*, 12(2), 144–154.
- Khan, G. F., & Wernet, W. (1997). Design of Enzyme Electrodes for Extended Use and Storage Life. *Analytical Chemistry*, 69(14), 2682–2687. <https://doi.org/10.1021/ac961208z>
- Mendoza-Madrigal, A. G., Chanona-Perez, J. J., Hernández-Sánchez, H., Palacios-González, E., Calderon-Dominguez, G., Mendez-Mendez, J. V., Blasco, J., & Villa-Vargas, L. A. (2013). Biosensores mecánicos en el área biológica y alimentaria: Una revisión. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(2), 205–225.
- Park, T.-M., Iwuoha, E. I., Smyth, M. R., Freaney, R., & McShane, A. J. (1997). Sol-gel based amperometric biosensor incorporating an osmium redox polymer as mediator for detection of l-lactate. *Talanta*, 44(6), 973–978. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(96\)02164-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0039-9140(96)02164-9)
- Rasmussen, M., Abdellaoui, S., & Minteer, S. D. (2016). Enzymatic biofuel cells: 30 years of critical advancements. *Biosensors and Bioelectronics*, 76, 91–102.
- Rathee, K., Dhull, V., Dhull, R., & Singh, S. (2016). Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 5, 35–54.

- Ricci, F., Amine, A., Palleschi, G., & Moscone, D. (2003). Prussian Blue based screen printed biosensors with improved characteristics of long-term lifetime and pH stability. *Biosensors and Bioelectronics*, 18(2), 165–174. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(02\)00169-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0956-5663(02)00169-0)
- Sato, N., & Okuma, H. (2006). Amperometric simultaneous sensing system for D-glucose and L-lactate based on enzyme-modified bilayer electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 565(2), 250–254.
- Sedenho, G., Lee, P., Toh, H. S., Salter, C., Ramos, S., & Compton, R. (2016). The Electro-Oxidation of Lactic Acid at Platinum Microparticles and Polycrystalline Platinum Electrode. *International Journal of Electrochemical Science*, 11, 2166–2176.
- Shiba, F., Mameuda, U., Tatejima, S., & Okawa, Y. (2019). Synthesis of uniform Prussian blue nanoparticles by a polyol process using a polyethylene glycol aqueous solution. *RSC Advances*, 9, 34589–34594. <https://doi.org/10.1039/C9RA07080J>
- Shitanda, I., Nohara, S., Hoshi, Y., Itagaki, M., & Tsujimura, S. (2017). A screen-printed circular-type paper-based glucose/O₂ biofuel cell. *Journal of Power Sources*, 360, 516–519.
- SS, K., & VA, A. (2016). Enzyme-Modified Screen-Printed Electrodes for Assaying Glucose, Ethanol, Lactate and Starch in Fermentation Media. *Fermentation Technology*, 05. <https://doi.org/10.4172/2167-7972.1000128>
- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., & Adley, C. (2010). An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances*, 28(2), 232–254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.12.004>
- Vizcaya Antolín, D. (2017). *Sensor electroquímico de lactato basado en el nanocomposite Ppy/AuNPs/LDH/NAD⁺ para el análisis de vinos.*
- Watabe, A., Sugawara, T., Kikuchi, K., Yamasaki, K., Sakai, S., & Aiba, S. (2013). Sweat constitutes several natural moisturizing factors, lactate, urea, sodium, and potassium. *Journal of Dermatological Science*, 72(2), 177–182.
- Wilson, W. (2014). *Low-noise, low-power transimpedance amplifier for integrated electrochemical biosensor applications.* Colorado State University.
- Zebda, A., Tingry, S., Innocent, C., Cosnier, S., Forano, C., & Mousty, C. (2011). Hybrid layered double hydroxides-polypyrrole composites for construction of glucose/O₂ biofuel cell. *Electrochimica Acta*, 56(28), 10378–10384.

10 Anexos



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE QUERÉTARO



CONCYTEQ



9° ENCUENTRO
DE JÓVENES INVESTIGADORES
DEL ESTADO DE QUERÉTARO
"Ideas jóvenes para impulsar el crecimiento del país"

El Comité Organizador otorga la presente

CONSTANCIA

a:

Salinas Ávila Erick y Ricardo Antonio Escalona Villalpando

Con el proyecto "Aplicación de un sensor alternativo de lactato no enzimático"

Por su valiosa participación en el Foro Académico en modalidad virtual que se llevó a cabo los días 18 y 19 de enero de 2022

Universidad Autónoma de Querétaro



Dr. Javier Ávila Morales
Secretario Académico



Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

SOMOS UAQ
FORO ACADÉMICO TRANSACCIONAL



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE QUERÉTARO



9° ENCUESTRO

DE JÓVENES INVESTIGADORES
DEL ESTADO DE QUERÉTARO

"Ideas jóvenes para impulsar el crecimiento del país"

El Comité Organizador otorga el presente

DIPLOMA

a:

**Salinas Ávila Erick, Ricardo Antonio Escalona
Villalpando, Luis Gerardo Arriaga Hurtado y Janet
Ledesma García**

Por haber obtenido el **SEGUNDO LUGAR** en el Bloque Medicina
y Ciencias de la Salud, con el proyecto denominado:
**"Aplicación de un sensor alternativo de lactato no
enzimático"**

18 y 19 enero de 2022
Universidad Autónoma de Querétaro


Dr. Javier Ávila Morales
Secretario Académico


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

SOMOS UAQ

SEIN COOPERATIVA TRANSFORMA