



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA ELÉCTRICA
SECCIÓN DE BIOELECTRÓNICA

Diseño y construcción de un sistema integrado de detección de ácido úrico en
saliva artificial

Tesis que presenta

Jessica Jetzabet Piedras Chávez

para obtener el Grado de

Maestría en ciencias

en la Especialidad de

Ingeniería Eléctrica

Codirectores de la Tesis: Dr. Juan Manuel Gutiérrez Salgado,
Dra. Rocío Berenice Domínguez Cruz.

Agradecimientos

Quisiera expresar mis agradecimientos a mi familia, por el apoyo incondicional que me han brindado. En especial a mi mamá, María del Rocío Chávez Gutiérrez, por su gran cariño, paciencia y guía. A mi hermana, Silvia Pilar Piedras Chávez, por los momentos que hemos pasado. Y a mi abuelita, Juana Gutiérrez Bermúdez, que se fue sin saber que ella fue parte de la razón de este trabajo.

A mi novio, Moisés Arreola Zamora, por ser parte de todos los buenos y malos momentos y por no ayudarme a seguir aun cuando la meta no parecía estar cerca.

A mis compañeros de la Sección de Bioelectrónica, especialmente a Elida, Jeniffer, Gerardo, David, Jonathan, Limón y Frank por hacer los ratos amenos, y por compartir sus conocimientos y amistad conmigo.

A mis asesores, Dra. Rocío Berenice Domínguez Cruz y Dr. Juan Manuel Gutiérrez Salgado, por su paciencia y guía durante este recorrido que es la tesis de maestría.

A los miembros del jurado, Dr. Arturo Vera Hernández y Dr. Lorenzo Leija Salas por todas las atenciones prestadas para la realización de este trabajo

A nuestra auxiliar de laboratorio Qfb. Isabel porque gran parte de este trabajo no podría haberse llevado a cabo sin su ayuda.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgar la beca gracias a la cual pude cursar mis estudios de maestría.

Resumen

Este trabajo presenta el diseño y construcción de un sistema de detección de ácido úrico (AU). El sistema está compuesto por un sensor electroquímico basado en un electrodo serigrafiado comercial modificado superficialmente con nanopartículas de oro, junto con la instrumentación electrónica capaz de registrar las señales generadas por la presencia de AU en saliva artificial. El desarrollo del sistema se divide en dos partes, la primera comprende el desarrollo del sensor químico mientras que la segunda aborda el diseño y construcción de la instrumentación electrónica para realizar el registro de señales por medio de la técnica de amperometría.

Para la preparación del sensor químico se utilizó como base un electrodo serigrafiado de carbón comercial (SPE). Posteriormente este electrodo fue pretratado para eliminar impurezas y se le llamó aSPE. A la superficie del aSPE se añadieron nanopartículas de oro (SPE-AuNPs) por medio de electrodeposición, con el fin de mejorar las propiedades electroquímicas y de detección. Finalmente, el sensor logró realizar la detección no enzimática de AU mediante la oxidación de este compuesto en la superficie modificada, mostrando mejoras en la respuesta conforme avanzaban las etapas de fabricación. El sensor no enzimático SPE-AuNPs fue capaz de detectar la presencia de AU en soluciones de búfer de fosfatos y saliva artificial.

El desarrollo de la instrumentación electrónica se basó en el circuito integrado (CI) LMP910000, del cual fue necesario realizar un ajuste de ganancias, optimización del ADC y comunicación serial a una interfaz de usuario (GUI). La programación del CI se realizó mediante el protocolo I²C y para la GUI se utilizó el software LabVIEW 2019. Para validar el sistema se utilizaron los sensores desarrollados SPE, aSPE y SPE-AuNPs, en soluciones de AU. Todas las mediciones hechas con el sistema electrónico diseñado se validaron utilizando un potencióstato portátil comercial de la empresa Metrohm, obteniendo en los dos dispositivos un comportamiento similar. El equipo desarrollado posee una sensibilidad de voltaje de 100 mV y una resolución de corriente de 1.2 nA. El

sistema completo de sensor no enzimático SPE-AuNPs junto con la instrumentación desarrollada obtuvo un límite de detección de 15 μM en saliva artificial, lo que lo hace adecuado para su uso potencial para la detección de AU en aplicaciones clínicas. Así mismo la instrumentación desarrollada probó ser confiable para registrar mediciones electroquímicas basadas en amperometría.

Abstract

This work presents the design and implementation of uric acid (UA) detection system. This system is formed by an electrochemical sensor based on a commercial screen-printed electrode (SPE) modified with gold nanoparticles, along with the electronic instrumentation for UA detection on artificial saliva. The developed system has two important sections; the first one was the electrochemical sensor development and the second one, the design and construction of electronic instrumentation for amperometry.

For the chemical sensor, a screen-printed electrode (SPE) was pre-treated for surface cleaning, resulting in activated SPE (aSPE). Then, gold nanoparticles were attached to the surface of aSPE by electrodeposition (SPE-AuNPs) to improve its electrochemical and detection properties. Therefore, the sensor was able to perform a non-enzymatic UA detection through oxidation of this compound on the modified surface, displaying an improved response as the fabrication stages were upgraded. Finally, non-enzymatic sensor SPE-AuNPs was able to detect UA in PBS and artificial saliva solutions.

Electronic instrumentation development was implemented using the integrated circuit (IC) LMP91000. It was necessary to adjust the gain of IC, perform ADC optimization and implement serial communication with a Graphical User Interface (GUI). The IC was programmed with I2C communication protocol and GUI was developed using LabVIEW. The fabricated sensors: SPE, aSPE and SPE-AuNPs were used for system validation. All measurements with the designed instrumentations were verified with a Metrohm commercial potentiostat, resulting in similar behavior of both devices.

In conclusion, the developed device showed a potential sensibility of 100 mV, while its current resolution was 1.2 nA. The complete system of non-enzymatic SPE-AuNPs sensor and electronic instrumentation achieved a limit of detection of 15 μ M in artificial saliva. Consequently, the system could be potentially used for UA detection on clinical

applications and the developed electronic instrumentation proved to be reliable for amperometric electrochemical measurement.

Índice

Capítulo 1.	1
1.1 Introducción.	1
1.2 Planteamiento del problema.	2
1.3 Objetivos.	3
1.3.1 Objetivo general.	3
1.3.2 Objetivos particulares.	3
1.4 Estructura de la tesis.	4
Capítulo 2.	6
2.1 Ácido úrico.	6
2.1.1 Detección de ácido úrico.	7
2.2 Métodos electroquímicos.	11
2.2.1 Voltamperometría cíclica.	13
2.2.2 Amperometría.	14
2.3 Sensores electroquímicos.	15
2.3.1 Criterios de desempeño de un sensor químico.	18
2.3.2 Tipos de electrodos.	20
2.3.3 Modificación superficial de electrodos para detección no enzimática.	21
2.3.3.1 Nanopartículas de oro.	22
2.4 Instrumentación electroquímica.	23
2.5 Estado del arte.	27
Capítulo 3.	33
3.1 Solución propuesta.	33
3.2 Desarrollo.	34

3.2.1 Desarrollo del sensor no enzimático.	35
3.2.1.1 Preparación de soluciones.	36
3.2.1.2 Preparación del electrodo.	38
3.2.1.3 Medición de ácido úrico.	40
3.2.2.1 Circuito Integrado LMP91000.	44
3.2.2.2 Convertidor analógico digital.	53
3.2.2.3 Tarjeta de adquisición.	58
3.2.2.4 Interfaz de usuario.	63
3.2.2.5 Diseño del circuito impreso	65
3.2.2.6 Diseño de carcasa	68
Capítulo 4.	72
4.1 Caracterización del sensor desarrollado.	72
4.1.1 Caracterización superficial y electroquímica de la superficie.	72
4.1.2 Caracterización por voltamperometría cíclica de la detección de ácido úrico.	75
4.1.2.1 Sensor serigrafiado de carbón.	76
4.1.2.2 Sensor serigrafiado de carbón modificado con nanopartículas de oro.	79
4.2 Detección de ácido úrico por amperometría con el sensor desarrollado.	83
4.3 Uso del sistema de detección.	84
4.3.1 Optimización del sistema de medición.	85
4.3.1.1 Evaluación de amperometría a potencial de +0.4 V.	85
4.3.1.2 Evaluación de amperometría a potencial de +0.5 V.	88
4.4 Detección de ácido úrico en buffer de fosfatos y en saliva artificial.	91
4.4.1 Detección de ácido úrico en buffer de fosfatos.	91
4.4.1.1 Amperometría con sensor serigrafiado de carbón.	91

4.4.1.2 Amperometría con sensor serigrafiado de carbón pretratado.	93
4.4.1.3 Amperometría con sensor serigrafiado de carbón con nanopartículas de oro.	95
4.4.1.4 Comparativa entre sustratos.	96
4.4.2 Detección de ácido úrico en saliva artificial.	100
4.4.2.1 Amperometría con sensor serigrafiado de carbón.	100
4.4.2.2 Amperometría con sensor serigrafiado de carbón pretratado.	102
4.4.2.3 Amperometría con sensor serigrafiado de carbón con nanopartículas de oro.	104
4.4.2.4 Comparación entre sustratos.	105
4.4.3 Amperometría con el uso de otros materiales.	110
4.5 Sistema integral de detección desarrollado.	114
Capítulo 5.	117
5.1 Conclusiones y perspectivas.	117
5.4 Trabajo a futuro.	119
Bibliografía.	121
Apéndice A. Productos.	131
Congresos.	131
Apéndice B. Cálculos para las soluciones utilizadas.	139
Apéndice C. Manual de usuario interfaz gráfica.	146

Capítulo 1.

1.1 Introducción.

El ácido úrico (AU) es el producto final del metabolismo de las purinas derivadas de la dieta de los ácidos nucleicos degradados por las células. Es producido en el hígado, los músculos e intestinos y se encuentra diluido en sangre para posteriormente ser filtrado en el riñón y excretado en la orina [1]. Concentraciones elevadas de este compuesto pueden estar asociados a un problema congénito que afecta el metabolismo de las purinas [2], o debido a la dieta [3]. Ya sea como proceso causal o secundario de diversos padecimientos, el AU es un marcador relevante para el diagnóstico y prevención de enfermedades.

De acuerdo con estudios epidemiológicos realizados en México durante el 2016 [4, 5], cerca del 10 % de la población padecía hiperuricemia, definida como concentraciones de AU en sangre por encima de los 6.8 mg/dL (equivalentes a 404 μ M) [6], la cual se relaciona con otros padecimientos como: diabetes *mellitus* 2 [4], hipertensión arterial [6], enfermedad renal [7], síndrome metabólico [8], gota [9], entre otros. De estos padecimientos resaltan la hipertensión arterial y la diabetes *mellitus* por ser las de mayor prevalencia, 16% [4] y 8.8% [10] respectivamente, a nivel mundial.

La detección temprana de enfermedades juega un papel importante al prevenir complicaciones, mejorar la respuesta al tratamiento o prevenir la reaparición del padecimiento [11]. La herramienta más común para la revisión del estado de salud, son los estudios de laboratorio, los cuales tienen por objetivo medir las concentraciones de biomarcadores específicos que puedan alertar sobre la presencia o progresión de alguna enfermedad [12]. Estos exámenes utilizan muestras de tejidos o fluidos corporales, siendo la sangre y orina los habitualmente elegidos. Los métodos analíticos más utilizados en estos estudios están basados en técnicas como la cromatografía líquida

[13], la espectrometría de masas [14], la colorimetría [15], la fluorescencia [16], la electroforesis capilar [17] o la absorción ultravioleta [18]. Los métodos analíticos anteriores a pesar de ser confiables y robustos requieren de una gran cantidad de muestra y reactivos, además de tiempos prolongados de análisis. Una opción económica y confiable a estos métodos es el uso de análisis electroquímicos para la determinación de biomarcadores, el AU incluido [12].

Para hacer esto posible son necesarios métodos de medición que brinden rapidez a las determinaciones y tengan flexibilidad en el análisis de muestras procesadas, es decir, que además del análisis de los medios tradicionales, como son sangre y orina, sea factible disponer de otras opciones que solventen esta necesidad de resultados rápidos. Una alternativa al uso de muestras provenientes de fluidos recolectados de forma menos invasiva. En este sentido, la obtención de muestras a partir de saliva, sudor o lágrimas resulta ser económica, rápida y sencilla debido a su carácter no intrusivo. Sin embargo, debido a los reducidos niveles de concentraciones de biomarcadores presentes en este tipo de muestras, se requiere del desarrollo de métodos de detección y monitoreo con mayor sensibilidad y selectividad a los disponibles actualmente.

1.2 Planteamiento del problema.

La medición de concentración de ácido úrico es de gran importancia para el diagnóstico, seguimiento y prevención de enfermedades relevantes tales como diabetes, hipertensión arterial, síndrome metabólico [2, 3]. Sin embargo, las técnicas tradicionales para la determinación de este compuesto orgánico basadas en técnicas analíticas requieren de una gran cantidad de analito y reactivos al igual que tiempos de análisis prolongados. Además de lo anterior, los equipos utilizados son costosos y demandan instalaciones especiales que limitan su portabilidad. En consecuencia, es de gran interés disponer de un método que permita un análisis rápido, económico de este biomarcador. En contraparte, los métodos electroquímicos brindan la posibilidad de determinar

biomarcadores con una perspectiva distinta de análisis con tiempos de procesamiento reducidos comparados con los métodos antes mencionados, amén de que existe una alta posibilidad de utilizar equipos de dimensiones reducidas [19]. Esta capacidad de miniaturización [20], puede observarse no sólo respecto de la celda electroquímica al utilizar electrodos serigrafiados, sino también de la instrumentación al poder utilizar equipos que se encuentran integrados en un solo chip. Lo que convierte a los sistemas electroquímicos en una alternativa atractiva con la que es posible ajustar la sensibilidad del sistema para hacer uso de fluidos no invasivos como matriz de detección, lo que evita la necesidad de personal y equipo especializado para su operación [21].

1.3 Objetivos.

1.3.1 Objetivo general.

Diseño y construcción de un sistema integrado para la detección de ácido úrico, compuesto por un sensor electroquímico no enzimático e instrumentación electrónica portable capaz de analizar la presencia de este analito en muestras de saliva artificial.

1.3.2 Objetivos particulares.

1. Fabricación de un sensor electroquímico no enzimático sensible a ácido úrico a partir de la modificación superficial de un electrodo serigrafiado de pasta de carbón de Metrohm (MOD 6.1208.110).
2. Desarrollo de instrumentación electroquímica a partir del circuito integrado LMP91000 de Texas Instruments para promover la reducción de dimensiones del sistema de medición.

3. Caracterización electroquímica del sensor modificado superficialmente utilizando tanto el potenciostato desarrollado a partir del LMP91000 como con el potenciostato comercial 910 PSTAT mini de Metrohm.
4. Determinación de ácido úrico en un medio controlado de búfer de fosfatos mediante la técnica de amperometría utilizando el potenciostato desarrollado.
5. Comparación del desempeño logrado con el potenciostato desarrollado contra el potenciostato comercial 910 PSTAT mini.
6. Evaluación del desempeño del sistema integrado empleando saliva artificial y la adición controlada de ácido úrico.

1.4 Estructura de la tesis.

Este documento está dividido en cinco capítulos y anexos. En este primer capítulo se discutieron tanto la problemática a la que se le pretende dar solución como los objetivos que se busca alcanzar con el trabajo de investigación.

El segundo capítulo aborda la importancia del ácido úrico y los métodos de detección, se explican también los sensores químicos y los tipos que existen, así como algunos de los materiales utilizados para la modificación superficial de los mismos. De igual forma se describe la instrumentación implementada para realizar mediciones con sensores químicos.

En el tercer capítulo se describe la propuesta de solución y la metodología de experimentación, así como el desarrollo de la instrumentación utilizada en este trabajo.

Por su parte, el capítulo cuatro presenta los resultados obtenidos a partir de la metodología e instrumentación antes descritos.

En el capítulo cinco se incluyen las conclusiones a partir de los objetivos planteados en un principio y el trabajo a futuro pensado para el proyecto de investigación.

Finalmente se anexan los diseños de instrumentación a detalle y los productos obtenidos durante el desarrollo de la tesis.

Capítulo 2.

2.1 Ácido úrico.

El ácido úrico (AU) es el producto final de las purinas, las cuales son bases nitrogenadas que pueden provenir de fuentes endógenas como el metabolismo de los ácidos nucleicos, y de fuentes exógenas como la ingesta de alimentos y algunos medicamentos [22]. El AU es producido mediante la acción enzimática de la xantina oxidasa, la cual convierte la hipoxantina proveniente de las purinas a xantina y luego desde xantina a AU (véase figura 1) [23].

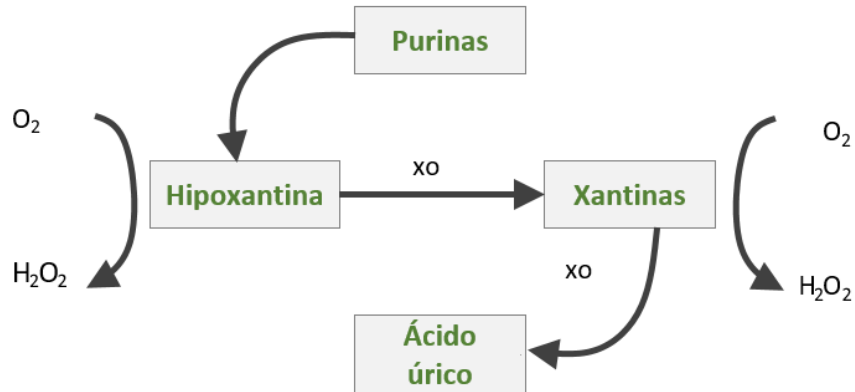


Fig. 1 Metabolismo de las purinas.

En humanos el nivel de AU es mayor que en otros mamíferos, ya que estos poseen una enzima llamada uricasa que metaboliza el AU. Debido a que los seres humanos no poseen activo el gen de la uricasa, no pueden oxidar el AU y por tanto el exceso de este es excretado por la orina [1].

Una producción excesiva de AU, una excreción deteriorada o la combinación de ambas deriva en lo que se conoce como hiperuricemia [24]. El padecimiento de hiperuricemia ha sido asociado a enfermedades como hipertensión, síndrome metabólico, diabetes, infarto del miocardio, disfunción renal crónica y lesión renal aguda [25]. Por ello la determinación

de AU en fluidos biológicos es de gran importancia para la diagnosis de diferentes enfermedades. En la tabla 1 se muestran los niveles normales de AU en muestras de fluidos biológicos como sangre, orina y saliva.

Tabla 1 Rango de detección de AU en fluidos biológicos [25].

Muestra	Rango de detección en sujetos sanos
Sangre	240 – 520 μM
Orina	1.49 – 4.46 mM/24h
Saliva	100 – 250 μM

2.1.1 Detección de ácido úrico.

El primer método para la detección de AU fue desarrollado en 1894 y se basaba en la reducción del ácido fosfotúngstico a azul de tungsteno por alantoina derivada de la oxidación del ácido úrico, como se muestra en la reacción descrita por la ecuación (2.1).



Posteriormente con el desarrollo de otros métodos analíticos como la fluorescencia, la cromatografía líquida, la espectrometría de masas, la colorimetría y la electroquimioluminiscencia [12], se han implementado diferentes ensayos para la detección de este compuesto. A continuación, se explican brevemente estos métodos.

Fluorescencia.

Es un proceso en el cual los átomos o moléculas son excitados mediante la absorción de radiación electromagnética. La molécula excitada libera su energía en forma de fotones [26]. En el caso de especies inorgánicas, orgánicas y bioquímicas se han desarrollado métodos de fluorescencia cuantitativos usando mediciones directas o indirectas. Las técnicas directas se basan en la reacción del analito con un agente que dará como resultado un complejo fluorescente. Las técnicas indirectas dependen de la disminución en fluorescencia, también conocida como apagamiento, como resultado de la interacción del analito con un reactivo fluorescente [12].

En cuanto al ácido úrico, las muestras son diluidas con buffer de fosfatos salinos y centrifugadas [27]. En algunas aplicaciones se utiliza el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) proveniente de la reacción enzimática con la uricasa (véase ecuación 2.1) para reducir la fluorescencia de puntos cuánticos de carbón [16] o usando la habilidad del AU de reducir el óxido de Manganeso (MnO_2) a Manganeso (Mn^{+}) para habilitar la fluorescencia de los puntos cuánticos de carbón unidos a MnO_2 [28].

Esta técnica analítica tiene una gran sensibilidad y un amplio intervalo de concentración lineal, sin embargo, son pocas las especies fluorescentes y sufren de muchas interferencias ambientales.

Cromatografía líquida.

Las técnicas cromatográficas son quizá una de las aplicaciones más versátiles dentro de la química analítica [29]. Se utiliza para la separación, identificación y determinación de los componentes químicos de mezclas complejas. En general esta técnica utiliza dos fases: estacionaria y móvil. Los componentes de la mezcla de interés son llevados a través de la fase estacionaria por la fase móvil y la separación se basa sobre las

diferencias de velocidad entre los componentes de la fase móvil. Para realizar la detección se ayudan de técnicas basadas en absorción de radiación ultravioleta, electroquímica, espectrometría de masas, fluorescencia, entre otras [26].

Para la determinación de ácido úrico se ha utilizado cromatografía líquida en combinación con detección UV [12, 30]. Las muestras deben pasar por procesos como extracción líquido a líquido, donde se usa un solvente para separar los componentes a analizar de la muestra [31], o extracción en fase sólida que implica el uso de superficies sólidas porosas que interactúan con los compuestos a analizar absorbiéndose para después ser recuperados mediante solventes [32].

Espectrometría de masas.

Este método analítico permite obtener la masa molecular, composición elemental y en algunos casos, estructura química de un compuesto desconocido [33]. Un espectrómetro de masas produce iones a partir de la muestra de interés y los separa de acuerdo con sus valores de masa/carga (m/z), los detecta y posteriormente los grafica. Su uso en mezclas se ve limitado debido a que el gran número de fragmentos con diferentes valores de m/z produce espectros tan complejos que no resultan posibles de interpretar. Con el fin de mitigar estos problemas la espectrometría de masas se suele utilizar en conjunto a un método de separación [26].

La determinación de ácido úrico por este método se realiza a través del conjunto de cromatografía líquida y espectrometría de masas [34]. Esta técnica posee una sensibilidad alta, un rango lineal amplio y un límite de detección bajo, sin embargo, el equipo para realizar las determinaciones es muy costoso [12].

Colorimetría.

Los sensores colorimétricos muestran un cambio de color distinguible al reaccionar con el analito. Este cambio se puede distinguir a simple vista, pero se determina usando técnicas como la absorción de radiación visible. Los sensores de este tipo están constituidos por un receptor, la parte que reconoce, y el fluorocromo que transduce el reconocimiento en una señal visible [35].

En la detección de ácido úrico se ha utilizado como material fluorocromo las nanopartículas anisotrópicas de plata (Ag) y oro (Au) debido a que han demostrado ser sensibles a variaciones de longitud de onda [36].

Electroforesis Capilar.

Es una técnica de separación basada en las velocidades diferenciales de migración de especies con carga en un campo eléctrico de corriente directa aplicada [26]. La separación se logra al aplicar un campo eléctrico a través de un capilar que contiene un electrolito ya que los iones migrarán a través del capilar. Los rangos de migración dependen de los signos y magnitudes de carga, así como de su tamaño [37]. Se usa en conjunto con técnicas de detección como voltamperometría, quimioluminiscencia o espectrometría de masas [12]. En ácido úrico se ha utilizado la técnica de electroforesis capilar en conjunto con amperometría [38] o quimioluminiscencia [17] para realizar la detección en muestras de orina y sangre.

De lo anterior se hace evidente que cada uno de estos métodos está basado en una serie de reacciones que incluyen pasos adicionales o equipo costoso y no portable, por lo que el desarrollo de un método simple y rápido para la detección de ácido úrico es de gran interés.

Las técnicas electroquímicas han sido aplicadas para la determinación de distintos analitos en una gran variedad de matrices y son relativamente más rápidos comparados con los métodos de detección tradicionales [39]. Los sensores electroquímicos han despertado el interés de la comunidad científica debido a ventajas tales como: tiempos de análisis cortos, procedimientos experimentales simples, pueden ser aplicados a una gran variedad de muestras fisiológicas, instrumentación de un menor precio, alta sensibilidad y selectividad [40]. Debido a que el ácido úrico puede ser oxidado en los electrodos de trabajo más comúnmente utilizados en soluciones acuosas, enfocar su detección a métodos electroquímicos no enzimáticos es posible. Desafortunadamente la oxidación electroquímica del ácido úrico en electrodos comunes requiere grandes potenciales (mayor a 0.4 V) que pueden ser disminuidos al modificar químicamente los electrodos [41].

2.2 Métodos electroquímicos.

Las técnicas electroquímicas miden cantidades eléctricas, como la corriente o el potencial relacionados con parámetros químicos. Los procesos estudiados tienen lugar en una celda electroquímica, más específicamente en una interfaz solución-electrodo [42]. Los dos tipos principales de mediciones electroquímicas son potenciometrías y potencioestáticas. Las primeras determinan el potencial de la celda electroquímica con cero corriente mientras que en las segundas se inyecta un potencial a la celda, que fuerza a los electrones a moverse a través de la interfaz solución-electrodo, con el fin de medir la corriente generada, misma que está relacionada con la concentración del analito de interés [43].

Los métodos potencioestáticos miden la corriente resultante al aplicar un potencial a un sistema de tres electrodos: electrodo de trabajo, electrodo de referencia y contra electrodo (véase figura 2). La corriente resultante de una reacción generalmente es producida por la oxidación o reducción de especies electroactivas, lo cual depende no

solo de la concentración, sino también del material del electrodo, la naturaleza del analito e incluso del tipo de técnica utilizada [44].

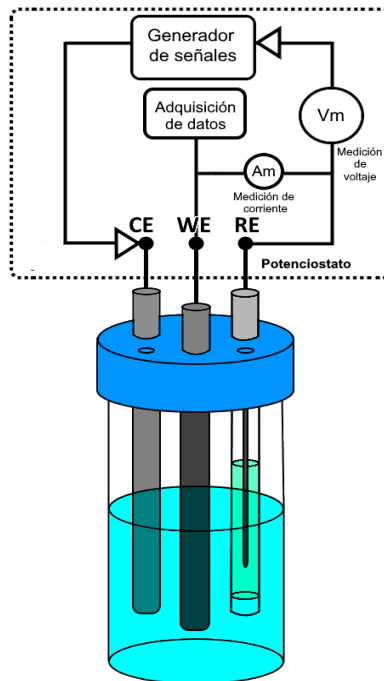


Fig. 2 Diagrama de conexión de una celda voltamperométrica. Electrodo auxiliar (Counter Electrode, CE), electrodo de trabajo (Working Electrode, WE), electrodo de referencia (Reference Electrode, RE).

En voltamperometría se aplica una señal de excitación de potencial variable a un electrodo de trabajo en una celda electroquímica, esta señal varía dependiendo del método voltamperométrico utilizado. Entre los métodos más comunes destacan la voltamperometría cíclica (VC), voltamperometría hidrodinámica, voltamperometría de pulso diferencial (DPV por sus siglas en inglés), voltamperometría de onda cuadrada (SWV por sus siglas en inglés) y amperometría. La señal de corriente obtenida se grafica contra la señal de entrada, a esta gráfica se le conoce como voltamperograma. A continuación, se describirán los métodos de voltamperometría cíclica y amperometría.

2.2.1 Voltamperometría cíclica.

En esta técnica, la respuesta de corriente en un electrodo estacionario colocado en una solución no agitada es provocada por una señal de excitación en forma de onda triangular. Esta señal se aplica a un paso constante, llamado velocidad de barrido, el cual avanza desde el potencial inicial hasta el potencial final y puede ir de 1 hasta 1000 mV/s, dependiendo el equipo utilizado [45]. La onda mostrada en la figura 3, corresponde a un proceso en el que el voltaje varía linealmente desde -0.3 V hasta 0.6 V, en una celda cuyo electrolito es $[\text{Fe}(\text{CN}_6)]/\text{KCl}$ y el electrodo utilizado es de carbón serigrafiado (figura 3B). La figura 6A muestra la aplicación de un ciclo de la señal triangular, pero esta técnica puede realizarse por varios ciclos.

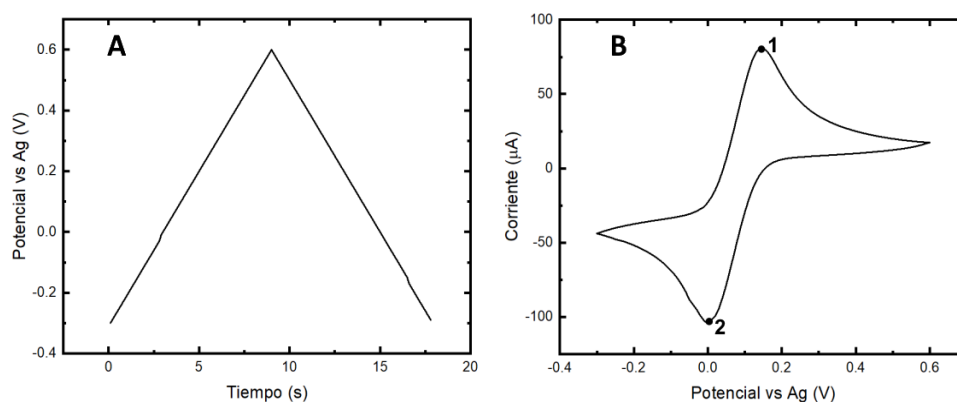


Fig. 3 A) Señal de excitación en voltamperometría cíclica. B) Señal obtenida de una voltamperometría cíclica en $[\text{Fe}(\text{CN}_6)]/\text{KCl}$ utilizando un electrodo serigrafiado de carbón. El punto 1 corresponde al pico de oxidación mientras que el punto 2 corresponde al potencial de reducción.

La VC es una técnica muy utilizada para adquirir información cualitativa de reacciones electroquímicas [42]. Ofrece la localización rápida, al usar velocidades de barrido entre 50 y 100 mV/s, de los potenciales de oxidación y reducción del analito de interés, mismos que son directamente proporcionales a la concentración (véase puntos 1 y 2 en figura 3B). El análisis de la posición y forma de estos picos y las corrientes asociadas a ellos brinda información relevante acerca de la naturaleza del proceso electroquímico que se está llevando a cabo entre la solución y el electrodo de trabajo [37].

2.2.2 Amperometría.

En la técnica amperométrica se mide la respuesta de corriente en función del tiempo cuando se aplica un potencial constante a un electrodo en una celda con electrolito en agitación. El potencial aplicado es suficiente para dar energía a los electrones con el fin de que ocurra una oxidación o reducción del analito de interés en la superficie del electrodo [46]. La corriente generada en el electrodo de trabajo es proporcional a la concentración del analito mientras la agitación sea constante [47]. En la figura 4A se presenta la señal de excitación de una amperometría, un potencial constante de 0.4 V vs Ag. El potencial aplicado al electrodo, en este caso, propiciará la oxidación del analito. La gráfica de corriente en función del tiempo se presenta en la figura 4B, los puntos señalan la adición de analito. Cada adición aumenta la concentración del analito lo que provoca un aumento de corriente.

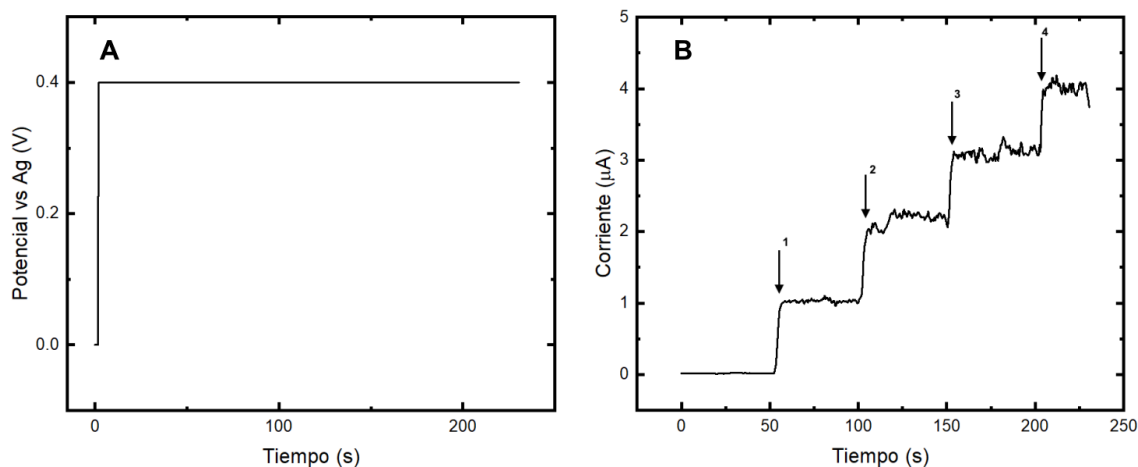


Fig. 4 A) Señal de excitación en una amperometría (potencial constante). B) Corriente en función del tiempo como respuesta a 4 adiciones de analito.

La selección del potencial aplicado al electrodo suele realizarse por medio de un análisis previo, donde se planea conocer la interacción entre la superficie del electrodo y el analito

de interés, específicamente los potenciales redox. La técnica mayormente utilizada para la obtención de los potenciales de oxidación y/o reducción es la VC [37].

Ventajas y desventajas de la amperometría.

La técnica amperométrica presenta numerosas ventajas que la hacen adecuada para su implementación en instrumentos portables, entre ellas se destacan:

- Relación directa entre la concentración y la intensidad de corriente (señal analítica).
- Está basada en reacciones que tienen lugar en la superficie del electrodo, por lo que no depende del volumen de la muestra o solución que se está midiendo.
- Es una técnica analítica simple, robusta y económica.
- La señal obtenida puede ser directamente procesable, lo que favorece su aplicación en el control de procesos y automatización.
- Los materiales que constituyen los transductores pueden ser simples y accesibles.

Su principal desventaja es el hecho de que todas las especies que tengan comportamiento redox similar al analito de interés, es decir que se reduzcan u oxiden a potenciales similares, interferirán en las medidas [37, 46, 47].

2.3 Sensores electroquímicos.

Un sensor químico, de acuerdo con la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), es un dispositivo que transforma la información química presente en una muestra en una señal con utilidad analítica. De manera ideal, un sensor químico, está conformado por dos partes: el receptor y el transductor (véase figura 5). El receptor es el elemento de reconocimiento, mientras que el transductor es un componente instrumental que transforma la interacción de las especies químicas en una señal procesable [48].

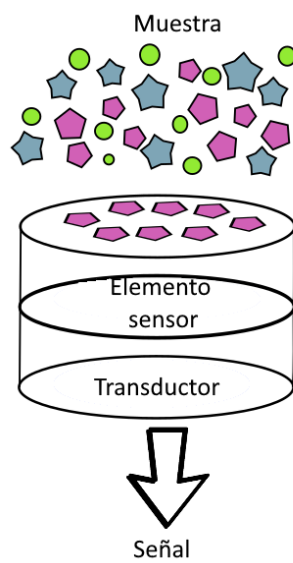


Fig. 5 Diagrama a bloques de un sensor químico.

Los sensores electroquímicos son una clase de sensores químicos cuya señal transducida es eléctrica, fácilmente procesable por métodos electrónicos. Estos dispositivos son altamente miniaturizables, lo que los hace muy útiles para realizar mediciones en pequeños volúmenes de muestra, en zonas de dimensiones reducidas o de difícil acceso [44]. Los sensores electroquímicos se pueden clasificar en virtud de las señales analíticas que se monitorea con ellos como: potenciométricos, amperométricos y conductimétricos [49].

Tabla 2 Clasificación de los sensores electroquímicos.

Tipo	Señal analítica	Aplicaciones
Potenciométricos	Potencial	Sensores sensibles a iones.
Amperométricos	Corriente	Detección de analitos, biosensores
Conductimétricos	Impedancia	Biosensores.

Sensores amperométricos.

Los sensores amperométricos están basados en la detección de especies electroactivas. La celda electroquímica para este tipo de sensores incorpora tres electrodos: electrodo de trabajo, donde ocurre la reacción redox; electrodo de referencia y electrodo auxiliar o contraelectrodo que completa el circuito eléctrico (véase Fig. 6). Esta celda puede considerarse como una caja negra a la cual se le aplica una determinada función potencial como excitación y se mide la función de respuesta en intensidad de corriente, mientras otras variables se mantienen constantes [44].

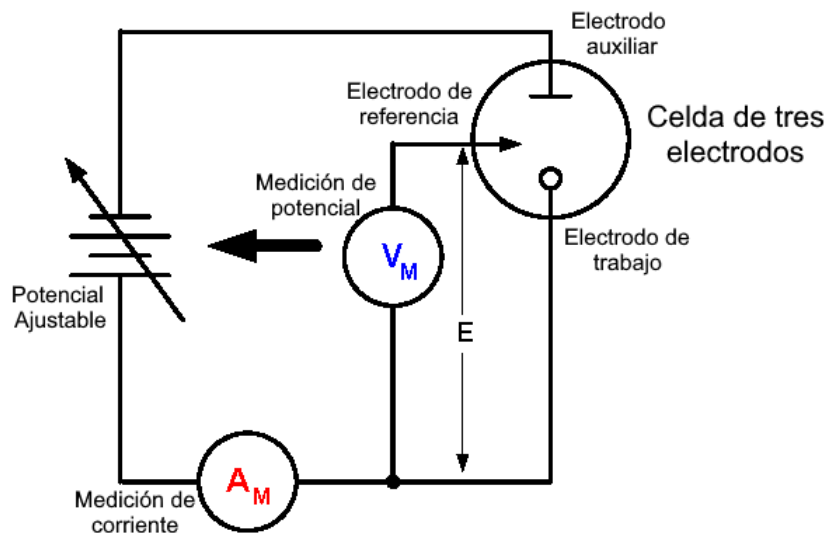


Fig. 6 Diagrama simplificado de una celda electroquímica.

El proceso de transducción se logra controlando el potencial del electrodo de trabajo a un potencial fijo (relativo al electrodo de referencia) y monitoreando la corriente en función del tiempo. Este potencial aplicado es la energía necesaria para que la transferencia de electrones del analito de interés y el sustrato del sensor comience. La corriente resultante es la medición directa de la tasa de transferencia electrónica, refleja el grado de reconocimiento y por lo tanto es proporcional a la concentración del analito [50].

La elección del material del electrodo de trabajo es crítico para su desempeño amperométrico, electrodos sólidos de materiales conductores relativamente inertes,

como el platino, oro y carbono, han sido ampliamente utilizados [44]. Estos sensores operan en una región donde el transporte de masa está limitado, lo que permite una respuesta lineal ante la concentración del analito. Se puede lograr mayor sensibilidad a través de convección forzada (agitado de solución, sensores rotatorios, etc.) para facilitar el intercambio electrónico [51].

2.3.1 Criterios de desempeño de un sensor químico.

El desempeño de cualquier sensor se puede evaluar calculando diversos parámetros tales como rango dinámico, sensibilidad, límite de detección, repetibilidad, reproducibilidad, precisión, tiempo de respuesta, tiempo de recuperación, entre otros [48], [52], [53]. A continuación, se describen los criterios aplicables a los sensores químicos con el fin de que queden claros al lector:

- **Linealidad:** el grado en que la curva de calibración del sensor se acerca a una línea recta.
- **Rango dinámico:** valores máximo y mínimo de concentración que pueden ser medidos por el biosensor.
- **Resolución:** mínima diferencia de concentración que es posible detectar con el sensor cuando ésta se varía de manera dinámica.
- **Sensibilidad:** el cambio en la señal medida por unidad de concentración que se define como $\Delta R / \Delta E$.
- **Límite de detección:** el nivel más bajo de concentración de analito que puede ser medido de manera fiable por el sensor.
- **Selectividad:** La capacidad del sensor para discriminar entre el analito de interés y las especies interferentes. Hay dos tipos de interferentes: los que en su constitución son parecidos a la especie química de interés y que por lo tanto provocan un falso positivo en la señal de salida; y los que inhiben la respuesta del sensor disminuyendo su señal de salida.

- **Tiempo de respuesta:** el tiempo que le toma al sensor producir una señal de salida al introducir en la solución la especie a determinar.
- **Tiempo de recuperación:** periodo mínimo requerido por el sensor para realizar mediciones consecutivas.
- **Reproducibilidad:** la habilidad del biosensor de dar respuestas idénticas bajo diferentes condiciones de medición.
- **Repetibilidad:** la capacidad de entregar la misma salida para entradas iguales aplicadas en un periodo.

En la figura 7 se muestra la curva de respuesta típica de un sensor químico. Es mediante esta curva que se pueden obtener algunos de los criterios antes descritos. En esta curva se puede observar que los sensores presentan tres zonas de trabajo: la primera corresponde a la saturación de la respuesta y permanece constante sin importar si la concentración del analito incrementa. La segunda zona corresponde al rango dinámico, en donde la respuesta del sensor es proporcional al estímulo recibido o concentración del analito. Finalmente, la zona de interferentes abarca las señales registradas más allá del límite de detección, en donde la respuesta del sensor es nula ante concentraciones mínimas del analito [49, 54].

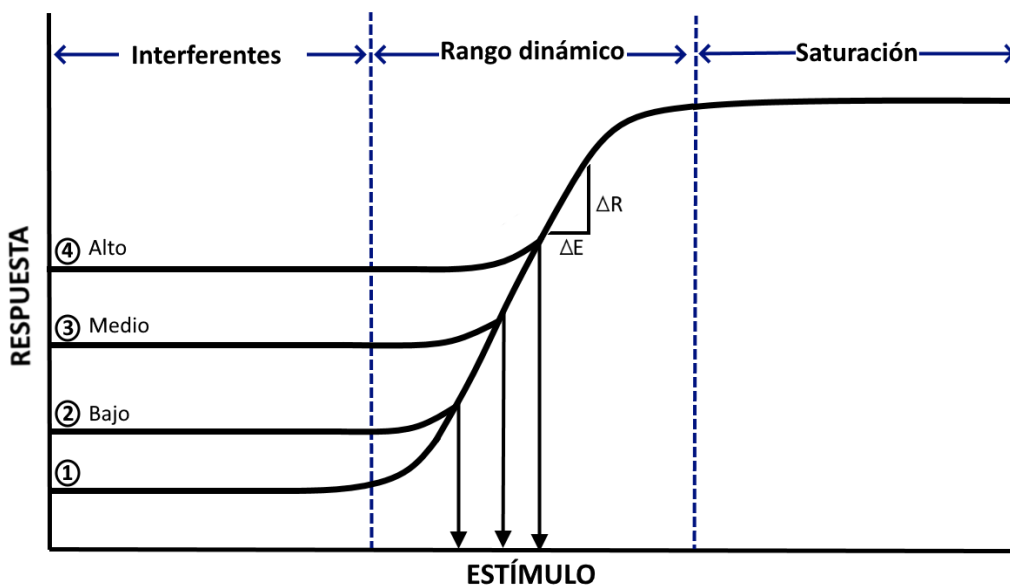


Fig. 7 Curva de respuesta de un sensor químico.

2.3.2 Tipos de electrodos.

Los electrodos de trabajo empleados en voltamperometría y amperometría tienen una variedad de configuraciones y formas. El conductor puede ser un metal noble, como platino u oro; un material de carbono o mezcla de partículas de carbono, como carbón vítreo, pasta de carbono o sensores serigrafiados [26]. Entre los más relevantes asociados a este trabajo están los electrodos de carbón vítreo y los electrodos serigrafiados.

El carbón vítreo o *glassy carbon* se forma por la pirólisis de un polímero precursor y presenta una microestructura compuesta por fragmentos de planos curvos de carbono que hacen densa su estructura [55]. Es un material de uso común como electrodo de trabajo en numerosas aplicaciones electroanalíticas debido a sus propiedades tales como baja reactividad, dureza, impermeabilidad y buena conductividad eléctrica [56].

Por su parte, los electrodos serigrafados (SPE por sus siglas en inglés) son dispositivos producidos al imprimir tintas en varios tipos de sustratos plásticos o cerámicos. La composición de las tintas usadas para imprimir los electrodos determina la selectividad y sensibilidad requerida para cada análisis [57]. Los sensores electroquímicos basados en SPE, son sistemas miniatura capaces de realizar mediciones *in vivo* e *in vitro* de muestras reales. La técnica de serigrafía (*thick film*) es muy usada para la fabricación a gran escala de estos electrodos con ventajas tales como bajo costo, versatilidad, miniaturización y alta reproducibilidad [58]. La gran versatilidad de los SPE se debe en gran medida a la amplia gama de modificaciones que se puede hacer en su composición y distribución. Un cambio en la composición de las tintas posibilita la inclusión de modificadores en su superficie como metales, enzimas, polímeros, compuestos orgánicos o inorgánicos [57].

2.3.3 Modificación superficial de electrodos para detección no enzimática.

Los biosensores son un subcampo de los sensores electroquímicos que ha experimentado un notable crecimiento. Estos dispositivos incorporan una biomolécula (enzimas, anticuerpos, ADN, etc.) inmovilizada en la superficie de un transductor electroquímico para realizar la detección de analitos de interés [59]. Un caso notable de esta tecnología es el éxito comercial del biosensor basado en la enzima glucosa oxidasa para el automonitoreo de glucosa en pacientes con diabetes *mellitus*. La detección por medio de la inmovilización de biomoléculas presenta ventajas como la selectividad inherente, sensibilidad y bajos límites de detección, pero a su vez se encuentra limitada por la baja estabilidad de los elementos biológicos. Por tanto, un avance en este campo es el uso de nanomateriales que imiten el funcionamiento de las enzimas como catalizadores, pero sin requerir el control de condiciones especiales de biocompatibilidad del medio, pH o temperatura que se necesita con los biosensores [60].

Diversos autores han propuesto modificaciones superficiales en el electrodo de trabajo mediante la adición de un material o nanomaterial [41]. La modificación química de la

superficie del electrodo de trabajo puede mejorar el transporte de electrones, lo que tiene como consecuencia la reducción del potencial de activación mejorando la actividad electrocatalítica hacia el analito de interés, mejorando la sensibilidad y aumentando la selectividad. Además, son menos propensos a una contaminación de la superficie y a formaciones de óxido en comparación con los electrodos simples [61, 62]. Para tales fines, es común la adición a la superficie del electrodo de polímeros conductores, nanopartículas metálicas, nanocompuestos provenientes del carbón, o materiales compuestos [63].

2.3.3.1 Nanopartículas de oro.

Estudios electroquímicos han revelado que las nanopartículas de oro (AuNPs) pueden actuar como excelentes catalizadores debido a su gran conductividad, gran área superficial, mejora en reactividad y estabilidad a condiciones ambientales [61, 64]. Los nanomateriales a partir del oro han sido usados una gran variedad de aplicaciones en campos como: física, química, catálisis, tecnología, biomedicina, ciencia de materiales y sensores electroquímicos, entre otros; debido a sus propiedades electrónicas, ópticas, magnéticas, térmicas y catalíticas [65]. Además, las propiedades intrínsecas de estos nanomateriales pueden ser controladas al modificar su forma y tamaño [66].

Han sido reportados varios métodos para realizar la síntesis de estas nanopartículas, entre los que se encuentran: métodos físicos, químicos, biológicos y electroquímicos [64]. En electrodos serigrafiados, las modificaciones basadas en nanopartículas de oro se pueden llevar a cabo mediante dos métodos diferentes: goteo o electrodeposición [67]. La técnica de goteo es el método más sencillo empleado para modificar electrodos serigrafiados, ya que solo se debe optimizar la cantidad de solución que debe ser depositada sobre el electrodo de trabajo. Sin embargo, debido a que las nanopartículas simplemente se posan sobre el material y posteriormente se secan sobre el electrodo, las estructuras tienden a aglomerarse y a aumentar su tamaño final [68].

La electrodeposición por su parte se basa en la reducción de especies, típicamente sales metálicas solubles en agua a cierto potencial o corriente con el fin de obtener un crecimiento controlado de las partículas de oro en el sustrato. Las sales usualmente empleadas son Ácido Cloroáurico (HAuCl_4) y Cloruro de Oro (AuCl_3). El tamaño y forma de las nanopartículas se controla de manera electroquímica modificando la corriente o potencial aplicado y el tiempo de deposición, este último modula la cantidad y tamaño de las nanopartículas de forma que, entre mayor tiempo, mayor serán las dimensiones y número de los nanocompositos [67, 69].

2.4 Instrumentación electroquímica.

Para la instrumentación electroquímica, la celda es un elemento con propiedades eléctricas que influyen en el desempeño de todo el instrumento. El dispositivo que mantiene el control del potencial aplicado a la celda es llamado potencióstato. En la figura 8 se presenta un potencióstato en el sentido más rudimentario, conectado a una celda de tres electrodos. Se muestra lo que sería una fuente de potencial fijo, una retroalimentación de este potencial con el fin de mantenerlo constante; cuenta también con un voltímetro dedicado a la medición de potencial y un amperímetro con el fin de medir la corriente en la celda. Los potencióstatos de hoy día no están integrados exclusivamente de esta manera, sin embargo, esta representación es útil para entender su funcionamiento [45].

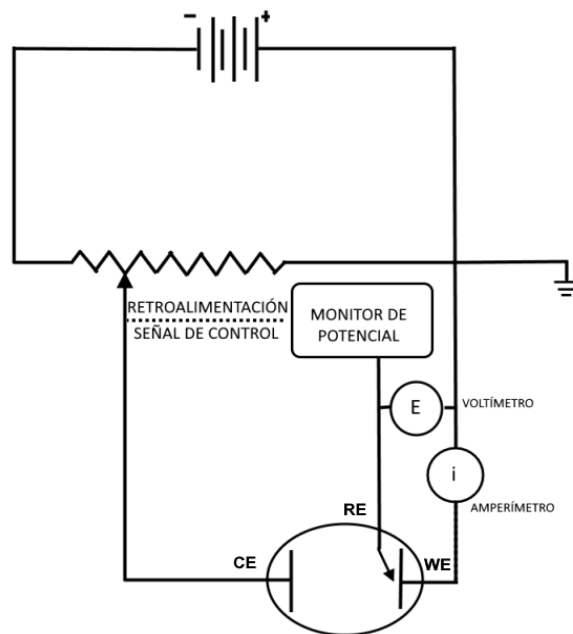


Fig. 8 Diagrama esquemático de un potenciostato rudimentario conectado a una celda de tres electrodos.

Hoy día estos instrumentos integran amplificadores operacionales para controlar y medir las relaciones corriente-potencial de las celdas electroquímicas [68]. En la figura 9 se presenta el diagrama funcional de un potenciostato actual. Aquí el amplificador denominado A está conectado a contraelectrodo (CE) con retroalimentación de su entrada inversora a electrodo de referencia (RE). Esto disminuye la diferencia entre las entradas de A y obliga a RE a asumir el potencial de entrada. En consecuencia, y debido a que la diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo (WE) y RE es cero, WE tendrá el voltaje aplicado por el generador de señales. Debido a que RE está conectado al potencial de entrada mediante el seguidor B que actúa como una fuente de alta impedancia, la corriente fluye por CE y no por RE. El flujo de corriente por RE no es deseable pues no se podría confiar en el potencial medido. Finalmente, el amplificador C monitorea la corriente en la celda y entrega un voltaje proporcional a la corriente medida, sin arrastrar corriente apreciable de la celda [26, 37]. Entre mayor sea la resistencia R_i el circuito será más sensible, sin embargo, el potencial no debe exceder el potencial de salida máximo del amplificador operacional [45]. Muchos instrumentos destinados a

efectuar mediciones electroquímicas se pueden ver como una combinación de tres circuitos: un generador de señal, que en el caso más sencillo es un generador de rampa útil para producir la señal de excitación de una voltamperometría cíclica [42], un potencióstato y un amplificador medidor de corriente.

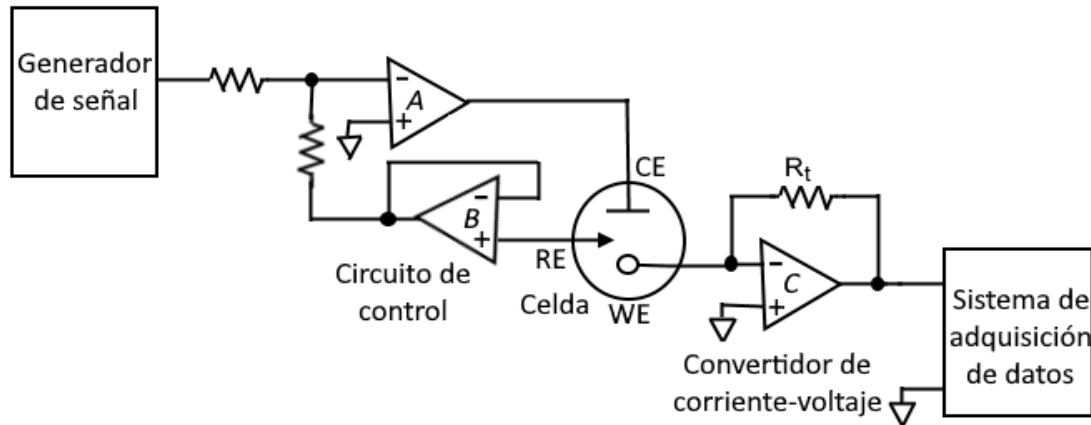


Fig. 9 Diagrama simplificado de un potencióstato de uso general.

Con la llegada de los circuitos integrados (CI) de gran escala en los últimos años, se ha producido una revolución en la instrumentación electroquímica al integrar dispositivos como un microcontrolador para fungir como generador de señal, gestionar la adquisición y el procesamiento de datos. Mientras que la parte del potencióstato y el convertidor de corriente a voltaje han permanecido analógicos. Los instrumentos que cuentan con un microcontrolador pueden realizar diferentes técnicas con solo implementar cambios vía el software integrado [37, 45].

En el diagrama a bloques de la figura 10 se presenta de forma general la conformación de un potencióstato electroquímico actual. Los bloques de potencióstato analógico y convertidor de corriente a voltaje fueron discutidos con anterioridad. En el generador de funciones de los potencióstatos controlados por computadora, tanto la modulación y la

forma de onda se encuentran controlados por software y pueden ser especificados por el operador [37]. Debido a que los microprocesadores analizan señales de carácter digital, para que estos puedan procesar información analógica es necesario utilizar un convertidor analógico-digital y otro convertido digital-analógico para fungir como interfaz entre la instrumentación analógica y la instrumentación digital [42]. El microprocesador, como se ve en el diagrama, es el encargado de mediar entre el generador de funciones y el convertidor analógico-digital mediante el software de control. Además, en algunos casos los datos se almacenan temporalmente en el dispositivo, puesto que al procesarse digitalmente pueden ser suavizados, promediados e incluso es posible identificar picos de corriente o de potencial de forma numérica [45].

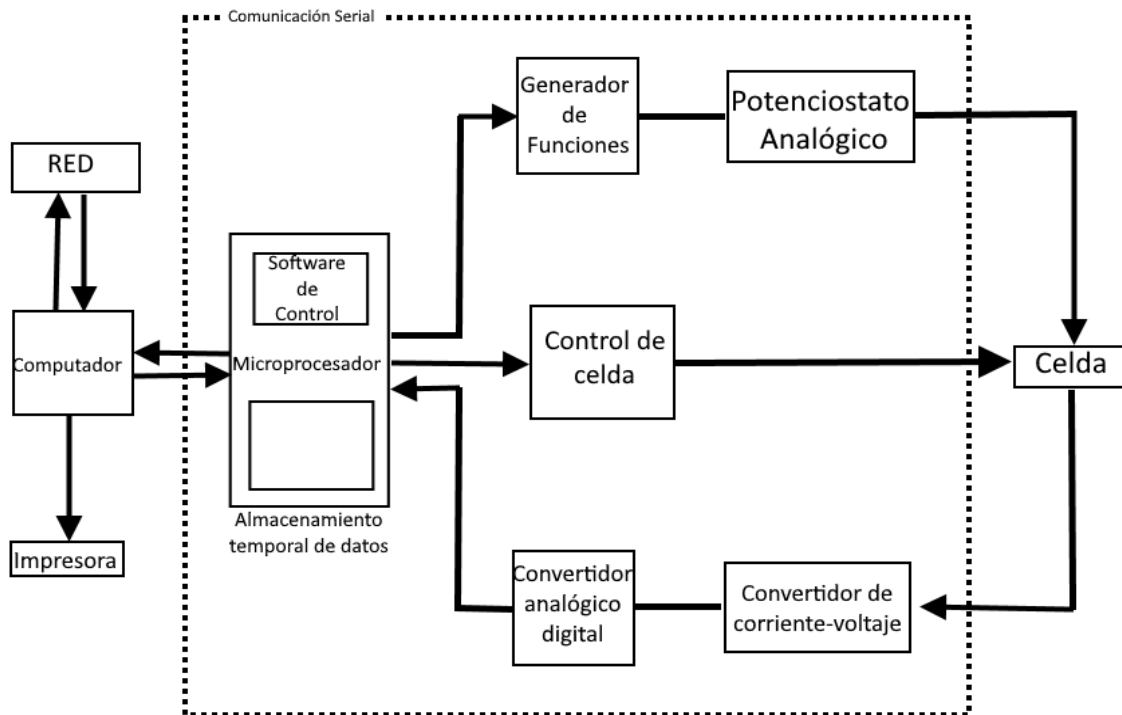


Fig. 10 Diagrama a bloques de un potenciómetro que integra varios accesorios.

2.5 Estado del arte.

Si bien la oxidación de AU tiene dos variantes que son: enzimática y no enzimática, el enfoque no enzimático es el de elección por ser relativamente simple, rápido y asequible al no involucrar la utilización de biomoléculas [41]. El AU puede detectarse sin el uso de enzimas por medio de la oxidación de este analito en la superficie de un electrodo convencional [12]. A pesar de esto, en un electrodo simple se requieren potenciales grandes para la oxidación de AU lo que conlleva un problema de selectividad al ampliar el rango de especies que actúan como interferentes [70]. Por lo que resulta común recurrir a procedimientos electroquímicos para modificar la superficie del electrodo de trabajo con la intención de reducir el potencial de oxidación del AU [41]. Estas modificaciones van desde una adición de nanocompuestos de carbón, uso de nanopartículas metálicas, hasta una combinación entre materiales.

Para la detección de AU de forma no enzimática, el uso de SPE presenta una alternativa viable. En 2005 Chen *et al.* [71] diseñaron un SPE de carbón para poder realizar detecciones de AU en sangre, con la ventaja de evitar un preprocesamiento de la muestra. Mediante la técnica de voltamperometría de onda cuadrada se obtuvo un rango de 0 – 1 mM, manteniendo una baja interferencia con respecto del ácido ascórbico (AA), un interferente común en este tipo de detecciones. Poco después, en 2009 Z. Chet *et al.* [72] desarrollaron un sensor desechable para la medición de AU en sangre sin diluir ni pretratar la muestra. Esto lo logró mediante el diseño de capas de un SPE, modificándolo con una capa hidrofílica para separar algunos compuestos de la muestra y añadiendo a la tinta del electrodo de trabajo un mediador para el intercambio electrónico. Con dichas modificaciones, el sensor obtuvo un rango lineal de 6 – 890 μM .

Otro proceso de modificación superficial para realizar la detección de AU es mediante un pretratamiento electroquímico sencillo aplicando voltajes constantes durante cierto

tiempo con el fin de ocasionar cambios morfológicos a la superficie del electrodo de carbón [73]. La activación electroquímica provoca una exfoliación de la superficie haciéndola más susceptible al intercambio electrónico [74]. En este sentido, en 2013 E. Alipour *et al.* [75] utilizaron un sensor de grafito pretratado mediante VC en una ventana de potencial de 1.5 a 2 V a una velocidad de 100 mV/s por 100 ciclos en PBS con un pH de 5.0 para detectar de manera simultánea AU y dopamina (DA). Este sensor logró un rango lineal de 1 – 160 μM , siendo probado en muestras de sangre y orina diluidas en PBS. Siguiendo con esta línea, D. Huang *et al.* [76] en 2015 realizaron un pretratamiento electroquímico a un electrodo de carbón vítreo en PBS a un pH de 7.0, exponiendo al electrodo a un potencial de oxidación de +1.75 V durante 300 s y luego a un potencial de reducción de -1.75 V por 300 s. Con este procedimiento se obtuvo un rango lineal de detección de 100 nM – 15 μM , valores que permitieron su utilización para medir AU en muestras de sangre y orina diluida en PBS.

En 2014, Wang *et al.* [77] realizaron una modificación superficial mediante nanopartículas metálicas. La modificación consistió en utilizar un electrodo de carbón vítreo y añadir óxido de grafeno reducido sobre el cual se electrodepositaron nanopartículas de oro a partir de HAuCl_4 . Con el sensor se obtuvo un rango lineal de 8.8 – 53 μM de AU utilizando como matriz de detección PBS (0.1 M, pH 7.0). La técnica empleada para las detecciones electroquímicas fue voltamperometría de pulso diferencial, que resultó útil para detectar de forma simultánea AU, AA y DA.

Por su parte en 2018 Ngamchuea *et al.* [78] utilizaron un microelectrodo de carbón para realizar la detección de AU en saliva artificial y en saliva humana, lograron un rango lineal de 0 – 120 μM mediante voltamperometría cíclica. Este sensor mantenía una interferencia del 10 % con respecto a otras especies electroactivas presentes en saliva (DA y AA). En la tabla 3 se desglosan los trabajos antes mencionados con el fin de que se aprecien en conjunto.

Tabla 3 Sensores desarrollados para la detección no enzimática de ácido úrico.

Tipo de electrodo	Modificador	Rango de detección	Límite de detección	Matriz	Referencia
SPE	-	0 – 1 mM	NR	Sangre	[71]
SPE	Capas de tinta separación reactivo/sangre	60 – 890 μ M	60 μ M	Sangre	[72]
Electrodo de grafito	Pretratamiento electroquímico en PBS (pH 7.0)	1 – 160 μ M	190 nM	PBS (0.1 M, pH 5.0), orina y sangre	[75]
Carbón vítreo	Pretratamiento electroquímico en PBS (pH 7.0)	100 nM – 15 μ M	20 nM	PBS, orina y sangre.	[76]
Carbón vítreo	AuNPs/RGO	8.8 – 53 μ M	1.8 μ	PBS (0.1 M, pH 7.0) Sangre de rata diluida.	[77]
Microelectrodo de carbón	-	0 – 120 μ M	20 μ	Saliva artificial y saliva humana	[78]

AuNPs: Nanopartículas de oro. RGO: Óxido de grafeno reducido.

La demanda de dispositivos portátiles para el diagnóstico sin necesidad de acudir a centros especializados ha llevado al incremento en el desarrollo de sensores electroquímicos especializados en la detección de biomarcadores. Con el fin de que estos dispositivos sean en verdad portables, se hace necesario el desarrollo de instrumentación de pequeñas dimensiones, capaz de realizar el registro de las señales generadas. En este sentido se han desarrollado trabajos que hacen uso de un CI que provee ya los dispositivos esenciales de un potencióstato o se hace uso de amplificadores operacionales para la inyección de potencial y la medición de corriente en la celda.

En lo correspondiente al uso de un C.I., en 2018 Aznar-Poveda *et al.* [79] utilizaron el dispositivo LMP91000 (Texas Instruments, TI) para desarrollar un potencióstato capaz de realizar VC. El instrumento fue evaluado mediante la detección de AA usando un SPE. Al utilizar un potencial de referencia fijo con valor de 5 V, la resolución de tensión del potencióstato fue de 100 mV. El microcontrolador utilizado fue una Raspberry pi 2 modelo B (Raspberry Pi Foundation), debido a que es un procesador embebido con periféricos, utiliza programación *open-source* y posee un gran desempeño computacional.

Ese mismo año, Monge *et al.* [80] crearon un dispositivo vestible dirigido a medición de glucosa en sudor por medio de amperometría. Para ello utilizaron también el LMP91000 en conjunto con un RFduino, el cual posee comunicación bluetooth eliminando con ello la necesidad de cables para el monitoreo de glucosa. El dispositivo que desarrollaron obtuvo una resolución de tensión de 50 mV. De igual manera, en 2018 Vineeth Raj *et al.* [81] utilizaron el LMP91000 en conjunto con un microcontrolador PIC16F1738 (Microchip) para el diseño de un potencióstato multicanal con una conectividad bluetooth, capaz de realizar tanto amperometría como VC. Para evaluar el dispositivo, utilizaron la oxidación de glucosa en un SPE de carbón con nanopartículas de óxido de cobre, y también compararon contra un potencióstato comercial. El potencióstato que fabricaron posee una resolución de tensión de 50 mV.

Como se mencionó, el uso de amplificadores operacionales en circuitos integrados para diseñar un potencióstato es otra forma de abordar la necesidad de instrumentación miniaturizable. En relación con esto, en 2018 Aleeva *et al.* [82] desarrollaron un biosistema para el monitoreo remoto de glucosa el cual consta de instrumentación electrónica dedicada a amperometría y un biosensor modificado superficialmente. Esta aplicación utilizó el microcontrolador STM8L y amplificadores operacionales de la familia TSV71x, ambos del fabricante STMicroelectronics, debido a su bajo consumo y potencial de compensación; el dispositivo utiliza también una memoria con identificación por radiofrecuencia para la lectura de datos. Ese mismo año Aymerich *et al.* (2018) [83]

reportaron un instrumento para la medición de alcohol en sangre mediante un smartphone y un biosensor electroquímico. El dispositivo utiliza la técnica amperometría para determinar concentraciones de etanol, a partir de un ATMEGA32UA (Microchip) y los circuitos integrados ADA4692 (Analog Devices) para hacer de potencióstato. La comunicación del sistema electrónico con el teléfono inteligente es mediante protocolo USB.

Finalmente, en 2020, Hoilett *et al.* [84] utilizó el circuito integrado LMP91000 para desarrollar un potencióstato portable capaz de realizar técnicas electroquímicas como VC, cronoamperometría, voltamperometría de barrido de pulso y voltamperometría de pulso normal. Se utilizó un microcontrolador SAMD21 (Atmel), ya que se puede programar con la plataforma de Arduino, facilitando el desarrollo de software. El microcontrolador empleado posee tanto un ADC como un convertidor digital analógico (DAC). Es gracias a la adición del DAC que se logró una resolución de tensión de 1 mV y mediante el ADC se logró un límite de cuantización de 4.5 nA. En paralelo se desarrolla un aptasensor para la detección de cocaína que fue utilizado para evaluar el instrumento desarrollado. La tabla 4 detalla las características de los proyectos anteriormente mencionados.

Tabla 4 Potenciostatos desarrollados a partir del LMP91000 (TI) y configuración de amplificadores operacionales.

Potenciostato utilizado	Microcontrolador	Analito	Resolución de tensión	Técnicas voltamperométrica	Límite de cuantización	Ref.
LMP91000	Raspberry	AA	50 mV	VC	NR	[79]
LMP91000	Rfduino	Glucosa	50 mV	Amperometría	NR	[80]
LMP91000	PIC16LF1783	Glucosa	50 mV	Amperometría	NR	[81]
TSV71x	STM8L	Glucosa	NA	Amperometría	9.24 μ A	[82]
ADA4692	ATMEGA32U4	Alcohol	NR	VC, Amperometría	4.5 nA	[83]
LMP91000	SAMD21	Cocaína	1 mV	VC, Amperometría, SWV, NPV	4.5 nA	[84]

SWV: voltamperometría de onda cuadrada. NPV: voltamperometría de pulso cuadrado.

Capítulo 3.

3.1 Solución propuesta.

En este trabajo se propone el desarrollo de un sistema amperométrico compuesto por un sensor químico modificado con nanopartículas de oro y un potenciostato portátil a partir de un *front-end* analógico programable (AFE por sus siglas en inglés) de Texas Instruments (TI) con el fin de realizar la determinación de ácido úrico (AU) en saliva artificial.

El sensor químico se desarrollará a partir de electrodos del tipo serigrafiado (SPE) de Metrohm (MOD 6.1208.110), ya que son de tamaño reducido y poseen una configuración de tres electrodos, lo que permite que las dimensiones de la celda electroquímica sean reducidas [58]. El SPE empleado cuenta con un electrodo de trabajo de carbón que se modificará superficialmente mediante la electrodeposición de nanopartículas de oro con el fin de modificar los potenciales de oxidación del AU.

El diseño electrónico del potenciostato portable se basará en el chip LMP91000 de TI, que integra los elementos pertinentes para generar el potencial necesario para el proceso de determinación de AU mediante la técnica de amperometría. El LMP910000 se configura por medio del protocolo I²C y además entrega un voltaje analógico proporcional a la corriente medida en el electrodo de trabajo [85]. Debido a esta señal analógica entregada por el dispositivo es necesario emplear un convertidor analógico digital. En este trabajo, se usará el ADS1115 de TI que también opera bajo un protocolo de comunicación I²C [86]. Ambos dispositivos estarán conectados a una tarjeta de desarrollo basada en el microcontrolador de doble núcleo ESP32 de Espressif Systems [87], el cual servirá para configurar el potenciostato con la técnica amperométrica necesaria, al tiempo que fungirá como el dispositivo de adquisición de datos (DAQ, por sus siglas en inglés) y

de comunicación con una computadora personal (PC, por sus siglas en inglés). La gestión completa del sistema se llevará a cabo mediante una interfaz gráfica programada en LabVIEW 2019 con una PC para el almacenamiento, visualización de la información y control del potencial de la amperometría.

Finalmente, la unión del sensor electroquímico no enzimático y la instrumentación desarrollada se aplicará para la detección de AU en muestras de PBS y saliva artificial. Los resultados analíticos obtenidos serán contrastados contra lo registrado en el potenciostato comercial 910 PSTAT mini de Metrohm.

3.2 Desarrollo.

En este apartado se explicará de manera separada el desarrollo del sensor no enzimático y el sistema de amperometría portable.

El desarrollo del sensor químico consistió en la caracterización del electrodo de carbón y sus posteriores modificaciones superficiales mediante VC utilizando el par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{KCl}$. Este compuesto es un modelo del que se conoce ya el comportamiento electroquímico y por ello es muy útil para determinar la actividad electroquímica de la superficie del electrodo de trabajo y de sus posteriores modificaciones [88]. También se realizaron pruebas utilizando AU en buffer de fosfatos con VC, con el fin de comparar las mediciones obtenidas del SPE y de la adición de nanopartículas de oro a su estructura.

Con respecto a la instrumentación, se explica el funcionamiento del potenciostato y la configuración de este para operar con una celda de tres electrodos. También se describe la estructura del convertidor de corriente a voltaje y el sistema de ganancias programables disponibles en el LMP91000. Así mismo se menciona el modelo empleado para la puesta

a punto del ADC ADS1115, su conexión con el LMP91000 y el DAQ. Finalmente se incluye la información concerniente al desarrollo de la interfaz gráfica.

3.2.1 Desarrollo del sensor no enzimático.

El desarrollo del sensor requiere de un proceso de tres etapas principales. La primera etapa es la caracterización de sustrato de carbón del SPE (depositado de fábrica por Metrohm). La segunda etapa, consiste en efectuar un pretratamiento electroquímico orientado a conseguir una activación de la superficie del sensor, denotada como aSPE, misma que se asocia con la generación de una mayor superficie de contacto del electrodo de trabajo. Finalmente, en la tercera etapa, la superficie de carbón activada se somete a una electrodeposición de nanopartículas de oro, denotando este proceso en el electrodo como SPE-AuNPs. Este proceso se ilustra en la figura 11.

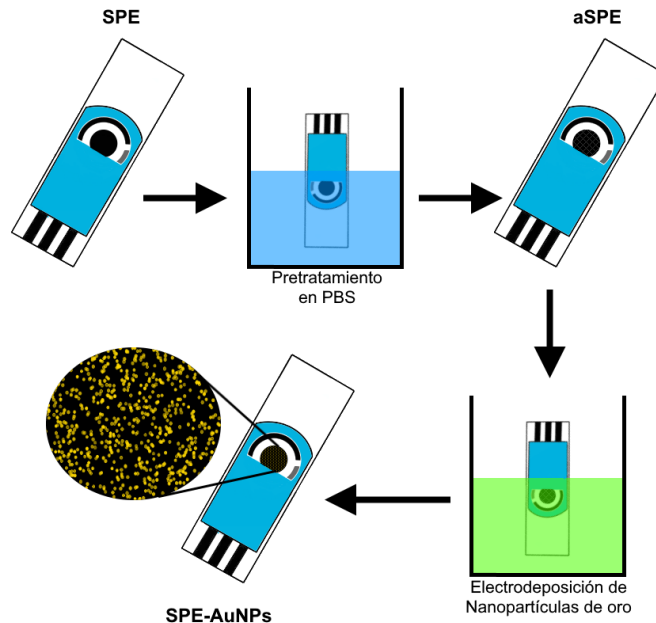


Fig. 11 Diagrama de etapas de desarrollo del sensor no enzimático.

Para los procedimientos electroquímicos como son: voltamperometría cíclica, amperometría y electrodeposición, se utilizó el potenciostato de laboratorio 910 PSTAT mini de Metrohm.

3.2.1.1 Preparación de soluciones.

Los reactivos utilizados, todos de grado analítico, fueron adquiridos en Sigma-Aldrich, AU (69-93-2), NaCl (7647-14-5), KCl (7447-40-7), Na₂HPO₄ (7558-79-4), KH₂PO₄ (7778-77-0), H₂SO₄ (7664-93-9), H₂SO₄ (16961-25-4). La saliva artificial (pH 7.0) empleada es de Laboratorios Viarden México. El agua utilizada en todos los experimentos fue bidestilada.

Los cálculos correspondientes a la preparación de todas las soluciones que se utilizaron a lo largo del trabajo se pueden encontrar en el apéndice B.

Buffer de fosfato salino.

El buffer de fosfatos (PBS por sus siglas en inglés) es una solución amortiguadora de pH comúnmente empleada en procedimientos bioquímicos, pues posee una osmolaridad y concentración de iones (Cl⁻, Na⁺ y K⁺) que asemejan a la del líquido celular. Debido a que es una solución isotónica y no tóxica, es el medio fisiológico utilizado para la mayoría de estudios biológicos [89]. La concentración de fosfatos utilizada en este trabajo es de 0.1 M a pH 7.4. A continuación se muestra el procedimiento para la elaboración de un litro de PBS [90].

1. Disolver 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na₂HPO₄ y 0.24 g de KH₂PO₄ en 800 mL de agua.
2. Ajustar pH a 7.4 con NaOH y aforar a 1 L con agua bidestilada.

3. Esterilizar en autoclave a 15 psi (1.05 kg/cm²) durante 20 minutos en ciclo líquido.
4. Se conserva en refrigeración a 4 °C.

Soluciones de ácido úrico en buffer de fosfatos.

Las soluciones de AU a diferentes concentraciones se obtuvieron a partir de una solución madre de 1 mM. Estas soluciones se prepararon semanalmente, ya que cuando se usaron soluciones con mayor tiempo las señales no mostraban actividad electroquímica. Las concentraciones consideradas para la fase experimental son: 1, 2.5, 5, 50, 100 y 200 µM. Además de la dilución de ácido úrico en buffer PBS, las muestras utilizadas tanto para amperometría como voltamperometría no requirieron procesos adicionales para su manipulación.

Soluciones de ácido úrico en saliva artificial.

Para evaluar la detección de AU en saliva artificial se utilizaron soluciones de 100, 200, 500 µM obtenidas a partir de una solución madre de 1 mM. Estas se obtienen utilizando los mismos cálculos empleados para el buffer de fosfatos, pero utilizando saliva artificial como solvente. Las soluciones de AU en saliva artificial no requirieron mayores procedimientos que los de agitación y adición controlada de NaOH para conseguir la disolución de AU. Una vez disuelto el AU, las soluciones se almacenaron a temperatura ambiente.

Solución para la electrodeposición de nanopartículas de oro.

La solución utilizada para la electrodeposición de nanopartículas de oro se obtuvo a partir de la dilución de H₂AuCl₄ en H₂SO₄. El H₂SO₄ se preparó con una concentración de 0.5 M

y se le agregaron los gramos correspondientes a 1 mM de HAuCl_4 . Los cálculos pertinentes a esta etapa se encuentran en el Apéndice B.

3.2.1.2 Preparación del electrodo.

Limpieza.

Debido a que los electrodos se utilizan en soluciones a diferentes concentraciones para su análisis mediante VC, realizar una limpieza que elimine los restos de soluciones anteriores es importante para evitar la contaminación de la superficie del electrodo [91]. A continuación, se describe el procedimiento seguido para la limpieza de cada electrodo utilizado:

1. SPE: se lava en un inicio con agua bidestilada, seguido de alcohol etílico con una concentración de 95%. Esto también se hace después de cada medición.
2. aSPE: se lava con PBS y agua desionizada después de activación y al terminar cada medición.
3. SPE-AuNPs: se lava con PBS y agua desionizada, al igual que el electrodo activado, en seguida de la electrodeposición y al finalizar la medición, al igual que el electrodo activado.

Pretratamiento.

Con el objetivo de mejorar la respuesta del sensor hacia el analito de interés, es necesario modificar la superficie del electrodo para que exista en ella mayor conducción. Una práctica muy utilizada antes de realizar una adición de material a la superficie del electrodo de trabajo es efectuar un pretratamiento de la misma. A este procedimiento también se le llama activación, debido a que mediante este se exponen sitios activos del

transductor [73]. Los electrodos serigrafiados comerciales son fabricados con tintas compuestas por carbono, partículas de grafito, polímeros y otros aditivos que ayudan a la dispersión, impresión y adherencia [74]. Estos compuestos extra afectan de manera notoria las propiedades electroquímicas del SPE [92]. El pretratamiento no solo limpia la superficie del electrodo, sino que también modifica su superficie.

Se han establecido varias técnicas de pretratamiento para los electrodos de carbón, tales como:

- Pulido.
- Limpieza mediante solventes.
- Tratamiento mediante vacío.
- Tratamiento térmico mediante láser.
- Tratamiento con plasma.
- Pretratamiento Electroquímico.

De los métodos antes mencionados, el pretratamiento electroquímico es el más utilizado pues además de ser simple y económico (a diferencia del tratamiento mediante plasma, vacío o laser) [73], también resulta adecuado para el tratamiento de un SPE pues preserva la delgada superficie que podría llegar a ser removida empleando técnicas como el pulido o el uso de solventes [93].

Para el procedimiento de pretratamiento el SPE fue colocado en una celda electroquímica con suficiente buffer PBS para cubrirlo. Se inyectó un potencial positivo entre los electrodos de trabajo y referencia de 1 V durante 150 segundos, seguido de un potencial negativo de 1 V, nuevamente, durante 150 s. Finalmente se realizó una VC con 20 ciclos en una ventana de potencial de 0 – 0.8 V a una velocidad de 100 mV/s con el fin de terminar de limpiar la superficie [73].

Electrodeposición de nanopartículas de oro.

El proceso de electrodeposición se realizó utilizando 10 mL de la solución anteriormente descrita de $\text{HAuCl}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$ aplicando dos ciclos de VC en una ventana de potencial de -0.5 – 1 V vs Ag, con una velocidad de barrido de 20 mV/s [94]

3.2.1.3 Medición de ácido úrico.

En esta sección se describen los procedimientos para llevar a cabo la detección de ácido úrico para evaluar el efecto que las diferentes modificaciones superficiales tuvieron sobre los potenciales de oxidación típicos del AU se utilizó VC. Una vez identificados estos potenciales, se utilizaron estos valores para realizar la detección de AU mediante la técnica de amperometría utilizando tanto la instrumentación desarrollada como el potenciostato comercial. Las soluciones de AU fueron evaluadas primero utilizando PBS como electrolito de soporte, para observar el comportamiento de las señales en un medio controlado. Una vez que se probó la eficiencia del procedimiento se realizó la detección de AU en saliva artificial, para verificar que el sistema es viable aún en muestras complejas sin la necesidad de recurrir a un pretratamiento.

Voltamperometría cíclica.

Se caracterizó la respuesta del SPE ante concentraciones diferentes de AU mediante VC en una ventana de potencial de -0.2 a 0.6 V con una velocidad de 50 mV/s en una celda electroquímica de vidrio con un volumen de 20 mL como se muestra en la figura 12. Las concentraciones utilizadas en PBS fueron: 1 μM , 2.5 μM , 5 μM , 50 μM , 100 μM y 200 μM , mientras que en saliva artificial se utilizaron concentraciones de 100 μM y 200 μM y 500 μM . Estas pruebas se realizaron con el potenciostato comercial 910 PSTAT mini.

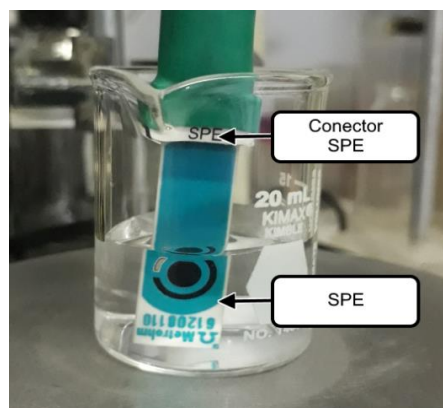


Fig. 12 Celda electroquímica para soluciones de ácido úrico.

Amperometría.

Se realizaron amperometrías a diferentes valores de potencia, los cuales se seleccionaron tomando en cuenta el potencial de oxidación registrado en las pruebas de VC. Para este método analítico se utilizó una celda de 10 mL con agitación suave, iniciando con un volumen de 8 mL de PBS o saliva artificial (véase figura 13) y haciendo adiciones de 200 μ L de una solución madre con una concentración 1 mM de AU. Los cálculos para las concentraciones añadidas durante la amperometría se anexan en el Apéndice B.

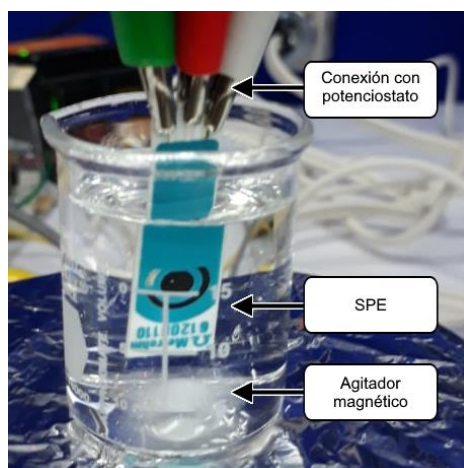


Fig. 13 Celda utilizada para la técnica de amperometría con el potenciostato desarrollado en este trabajo.

Para realizar la técnica de amperometría fue necesario agitar la solución, por lo que se utilizó un agitador magnético de la marca Thermolyne, Barnstead modelo S7805 con un rango de 0 a 1200 rpm (véase figura 14). Con PBS el agitador se utilizó en la posición uno que es equivalente a 120 rpm aproximadamente, mientras que, con la saliva artificial, al ser un fluido más viscoso, se utilizó la posición cinco que es equivalente a 600 rpm.



Fig. 14 Agitador magnético modelo S7805, Thermolyne.

El procedimiento utilizado para realizar amperometrías tanto en PBS como en saliva artificial se describe a continuación:

Paso 1: Con una micropipeta (Eppendorf Research ®) se toman 8 mL de PBS o saliva artificial y se introducen en el vaso de precipitados de 10 mL. La barra de agitación se coloca dentro del mismo vaso. Después se coloca el SPE asegurándose que no impida el libre giro de la barra de agitación. En este punto es importante asegurarse que los tres electrodos queden cubiertos por la solución (véase figura 13). La agitación se inicia a 120 rpm para PBS o 600 rpm con saliva artificial.

Paso 2: Se aplica un potencial entre el electrodo de trabajo y referencia mediante el potencióstato y se inicia el experimento.

Paso 3: Se dejan pasar 50 s para que el potencial se equilibre y entonces se hace una nueva adición de 200 μL de PBS o saliva artificial mediante el uso de una micropipeta (Eppendorf Research $\text{\textcircled{R}}$). Este paso se repite cada 50 s, hasta completar un total de 10 adiciones.

Este procedimiento se repite tanto con el aSPE, como con el SPE-AuNPs. Las detecciones de las concentraciones de AU se realizaron tanto con el sistema desarrollado en este trabajo como con el potencióstato 910 PSTAT mini para su validación.

3.2.2 Desarrollo del potencióstato.

La instrumentación electrónica diseñada, consta de cuatro subsistemas constituidos por un dispositivo específico cada uno. En la figura 15 se presenta el diagrama simplificado de las funciones que desempeña cada dispositivo para que se pueda implementar la técnica amperométrica. La interfaz de usuario fue programada en el software LabVIEW 2019 $\text{\textcircled{R}}$ y con ella es posible iniciar la comunicación serial con la tarjeta de desarrollo basada en el microcontrolador ESP32 para establecer el potencial con el que se realizará la amperometría. Con esta información el ESP32 configura al LMP91000 y obtiene la medición del potencial proporcional a la corriente que se genera en el electrodo de trabajo por parte del ADS1115 y la envía a la interfaz que la despliega al usuario mediante una gráfica en tiempo real.

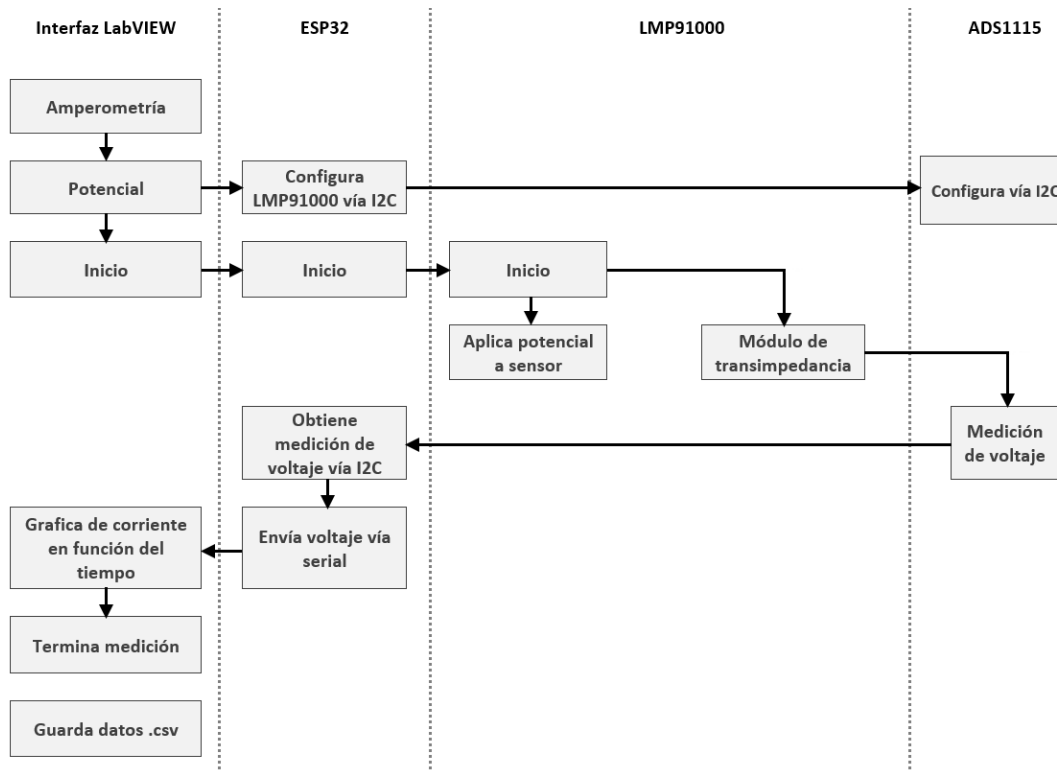


Fig. 15 Diagrama simplificado de las funciones a desempeñar por los subsistemas que constituyen la instrumentación electrónica.

3.2.2.1 Circuito Integrado LMP91000.

El CI LMP91000 permite realizar procedimientos electroquímicos como: VC o amperometría en una celda de tres electrodos. El chip consta de un amplificador operacional conectado al contraelectrodo y un amplificador de transimpedancia (TIA, por sus siglas en inglés) que convierte la corriente del electrodo de trabajo a voltaje. El módulo de comunicación serial I²C permite la configuración del dispositivo en general. Durante su funcionamiento, el LMP91000 inyecta un potencial a la celda y entrega un voltaje proporcional a la corriente medida en el electrodo de trabajo del SPE. Una gran ventaja del uso de este encapsulado son sus dimensiones, lo que ayuda a que el sistema

final pueda ser portable. En la figura 16 se muestra un diagrama esquemático simplificado del potencióstato en la configuración de celda de tres electrodos.

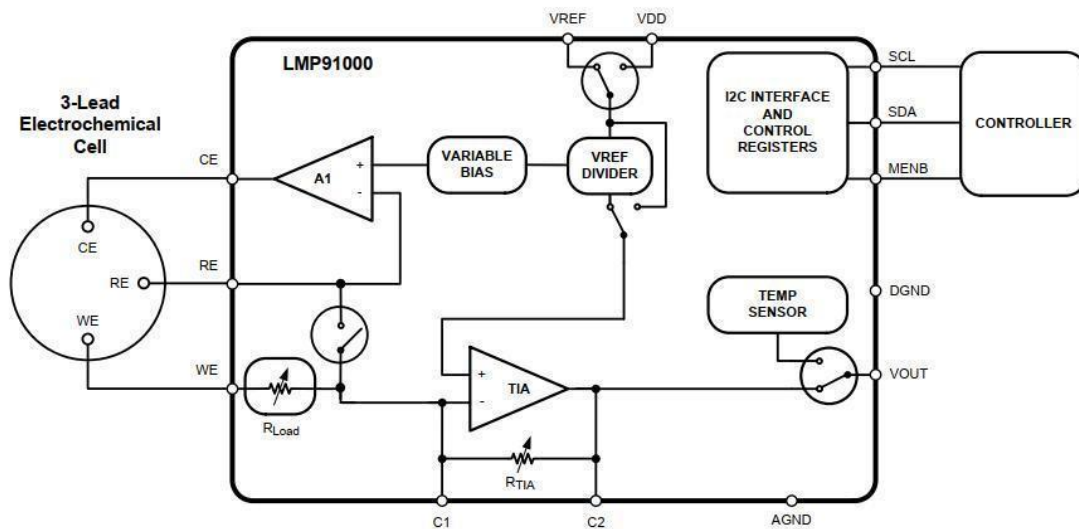


Fig. 16 Esquemático simplificado del potencióstato LMP91000 [85].

La ganancia del módulo TIA se puede modificar vía software. El LMP91000 posee siete resistores diferentes: 2.75 k Ω , 3.5 k Ω , 7 k Ω , 14 k Ω , 35 k Ω , 120 k Ω y 350 k Ω , todas con tolerancia del 5%. La fuente de referencia de voltaje (VREF) también puede ser seleccionada vía software, pudiendo provenir del mismo voltaje de alimentación o de un potencial externo que se conecta al pin 11 del chip. El pin de electrodo de referencia (RE) del CI es importante, ya que de este se obtiene el voltaje que se inyecta a la celda electroquímica, por lo que el potencial que entrega debería ser lo más estable posible. El LMP91000 hace esto mediante un divisor de voltaje que consta de 14 posiciones, obteniendo porcentajes del voltaje de referencia de: 0%, 1%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%, 22% y 24%. Es también a partir de esta referencia que se obtiene el cero interno del dispositivo, mismo que también es un porcentaje del voltaje de referencia con valores de: 20%, 50% y 67%.

La comunicación mediante I²C posee dos líneas, SCL y SDA. En el LMP91000 además de estos pines, se tiene un pin llamado MENB el cual debe colocarse en estado bajo para iniciar la comunicación con el maestro. Este pin es útil cuando se conectan más de un LMP91000 al mismo maestro. Si solo se conecta un potenciómetro el pin MENB puede ser puesto a tierra. Las operaciones de lectura y escritura son como en la mayoría de los dispositivos I²C:

Escritura: El maestro envía la dirección de 7 bits del LMP91000 (0x48) y el bit de escritura, si la dirección es correcta el LMP91000 envía el reconocimiento al maestro y posteriormente el maestro envía la dirección del registro y después del dato a escribir.

Lectura: El maestro envía la dirección de 7 bits del LMP91000 (0x48) y el bit de lectura, si la dirección es correcta el LMP91000 envía el reconocimiento al maestro, el cual envía la dirección del registro a leer y finalmente el LMP91000 envía al maestro lo que hay en el registro elegido.

Para poder configurar el potenciómetro se debe acceder al registro LOCK con dirección hexadecimal 0x01, ya que éste habilita o deshabilita la escritura en los registros. El último bit debe cambiar a 0 para poder habilitar la escritura. Una vez habilitada la escritura se accede al registro TIACN mediante el cual se configura la resistencia del convertidor de corriente a voltaje. El registro REGFCN permite configurar la fuente de voltaje de referencia, el cero interno, así como la polaridad y el voltaje que es aplicado a la celda. Y finalmente el registro MODECN que permite seleccionar el modo de operación, que para la aplicación de este trabajo es celda de tres electrodos. En la tabla 5 se detallan las funciones de cada registro.

Tabla 5 Mapa de registros y funciones

<p>STATUS – Registro de estado. Dirección (0x00) Indica el estado del LMP91000.</p>		
Bit	Nombre	Función
[7:1]	Reservado	
0	STATUS	<p>Estado del dispositivo</p> <p>0 No listo (default)</p> <p>1 Listo</p>
<p>LOCK – Registro de protección. Dirección (0x01) Habilita y deshabilita la escritura en los registros.</p>		
[7:1]	Reservado	
0	LOCK	<p>Protección de escritura</p> <p>0 Registros 0x10 y 0x11 en modo de escritura</p> <p>1 Registros 0x10 y 0x11 en modo de solo lectura (default)</p>
<p>TIACN – Registro de control del módulo de transimpedancia. Dirección (0x10) Permite la configuración de la ganancia de transimpedancia y la resistencia de carga.</p>		
[7:5]	Reservado	Reservado
[4:2]	TIA_GAIN	<p>Selección de resistencia de retroalimentación</p> <p>000 Resistencia externa (default)</p> <p>001 2.75 kΩ</p> <p>010 3.5 kΩ</p> <p>011 7 kΩ</p> <p>100 14 kΩ</p> <p>101 35 kΩ</p> <p>110 120 kΩ</p>
		111 350 k Ω
[1:0]	RLOAD	<p>Selección de Resistencia de carga</p> <p>00 10 Ω</p> <p>01 33 Ω</p> <p>10 50 Ω</p> <p>11 100 Ω (default)</p>
<p>REFCN – Registro de control de referencia. Dirección (0x11)</p>		

Los parámetros en este registro permiten la configuración del cero interno, voltaje de celda y fuente de referencia.		
Bit	Nombre	Función
7	REF_SOURCE	Fuente de voltaje de referencia 0 Interno (default) 1 Externo
[6:5]	INT_z	Selección de cero interno (Porcentaje de la fuente de referencia) 00 20 % 01 50% (default) 10 67 % 11 circuito en baipás (solo con sensores de gas)
4	BIAS_SIGN	Selección de polaridad de voltaje de celda 0 Negativo (default) 1 Positivo
[3:0]	BIAS	Selección de voltaje de celda (Porcentaje de fuente de referencia) 0000 0% (default) 0001 1% 0010 2% 0011 4% 0100 6% 0101 8% 0110 10% 0111 12% 1000 14% 1001 16% 1010 18% 1011 20% 1100 22% 1101 24%
MODECN – Registro de control de modo. Dirección (0x12) Este registro permite la configuración del modo de operación del LMP91000.		
7	FET_SHORT	FET en corto circuito 0 Deshabilitado (default) 1 Habilitado

[6:3]	Reservado	
Bit	Nombre	Función
[2:0]	OP_MODE	Selección de modo de operación 000 Deep sleep (default) 001 Celda galvánica de 2 electrodos 010 Standby 011 Celda amperométrica de tres electrodos 110 Medición de temperatura (TIA OFF) 111 Medición de temperatura (TIA ON)

Programación de LMP91000.

Para la programación de este dispositivo, se empleó la plataforma de Arduino dado que cuenta con una librería específica para la configuración del LMP91000 [95]. El contenido de funciones de esta librería se revisó para corroborar su utilidad para manipular el set de instrucciones del dispositivo descrito en la hoja de datos del fabricante. De las funciones disponibles solo se utilizaron las siguientes:

- *setgain()*: esta función establece la ganancia del convertidor de corriente a voltaje.
- *setRLoad()*: en esta función se establece la resistencia de carga que se encuentra en serie con el electrodo de trabajo.
- *setIntZ()*: mediante esta función se fija el cero interno del potencióstato.
- *setThreeLead()*: esta función es importante ya que el LMP91000 también puede trabajar en modo dos electrodos, aunque en este caso no se utilizó
- *setPosBias()*: con esta instrucción el potencial en la celda será positivo.
- *setBias()*: esta función establece el valor del potencial de la celda, el cual como ya se explicó es un porcentaje del voltaje de referencia.

A continuación, se detallan las funciones ya mencionadas y cómo se configuraron para los propósitos del trabajo.

Setgain(user_gain)

```
A void LMP91000::setGain(uint8_t user_gain)
{
  gain = user_gain;
  unlock(); // permite la escritura en los registros
  uint8_t data = read(LMP91000_TIACN_REG);
  data &= ~(7 << 2); //limpia bits 2-4
  data |= (user_gain << 2); //escribe en bits 2-4
  write(LMP91000_TIACN_REG, data);
}
```

user_gain	
0	Resistor externo
1	2.75 kΩ
2	3.5 kΩ
3	7 kΩ
4	14 kΩ
5	35 kΩ
6	120 kΩ
7	350 kΩ

B

Fig. 17 A) Función utilizada para establecer la resistencia de ganancia del TIA. B) Valores que puede adoptar la variable user_gain.

La figura 17A presenta el código que establece la resistencia de ganancia del amplificador de transimpedancia y el valor se fija dependiendo del número del 1 - 7 que se coloque a la función (figura 17B). El número que se coloque en la función se escribe en los bits [4:2] del registro TIACN que se muestra en la tabla 5.

SetRLoad(load)

```
A void LMP91000::setRLoad(uint8_t load) const
{
  unlock();// permite la escritura en los registros
  uint8_t data = read(LMP91000_TIACN_REG);
  data &= ~3; // limpia bits [0:1]
  data |= load; // escribe en bits [0:1]
  write(LMP91000_TIACN_REG, data);
}
```

load	
0	10 Ω
1	33 Ω
2	50 Ω
3	100 Ω

B

Fig. 18 A) Función para establecer la resistencia en serie con el electrodo de trabajo. B) Valores que la variable load puede adoptar.

En la figura 18A se muestran las líneas de código que hacen posible la configuración de la resistencia en serie con el electrodo de trabajo (ver esquemático del LMP91000 para referencia figura 16). En la figura 18B se muestran los valores que se pueden colocar en la función. Esta función también escribe en el registro TIACN, pero en los bits [0:1].

SetIntRefSource(source)

```
void LMP91000::setRefSource(uint8_t source) const
{
    if (source == 0) setIntRefSource();

    else setExtRefSource();
}
```

Fig. 19 Función que establece la fuente de voltaje de referencia.

En la figura 19 se muestran las líneas de configuración de la fuente de voltaje de referencia, esta instrucción escribe en el bit 7 del registro REFCN, si se escribe un 1 el pin de referencia de voltaje estará abierto para una referencia externa, en caso contrario se toma el potencial de alimentación.

SetIntZ(intZ)

```
A void LMP91000::setIntZ(uint8_t intZ)
{
    zero = intZ;
    unlock();// permite la escritura en los registros
    uint8_t data = read(LMP91000_REFCN_REG);
    data &= ~(3 << 5); // limpia bits [6:5]
    data |= (intZ << 5); // escribe en bits [5:6]
    write(LMP91000_REFCN_REG, data);
}
```

B
intZ
0 – 20 %
1 – 50 %
2 – 67 %
3 – derivación

Fig. 20 A) Función que establece el cero interno del LMP91000. B) Valores que la variable intZ puede adoptar.

En la figura 20A se muestra el código que permite configurar el cero interno del potenciómetro analógico y en la figura 20B los valores que este cero interno puede tomar dependiendo del voltaje de referencia. Esta función modifica los bits [6:5] del registro REFCN.

SetThreeLead()

```
void LMP91000::setThreeLead() const
{
    uint8_t data = read(LMP91000_MODECN_REG);
    data &= ~(0x07);
    data |= (0x03);
    write(LMP91000_MODECN_REG, data);
}
```

Fig. 21 Función que pone al LMP91000 en modo celda amperométrica de tres electrodos.

La función en la figura 21 escribe un '011' en los bits [2:0] del registro MODECN, que le indica al dispositivo que debe estar en modo celda amperométrica de tres electrodos.

SetPosBias()

```
void LMP91000::setPosBias() const
{
    unlock();
    uint8_t data = read(LMP91000_REFCN_REG);
    data |= (1 << 4);
    write(LMP91000_REFCN_REG, data);
}
```

Fig. 22 Función que coloca la polarización del potencial de celda en positivo.

La función en la figura 22 escribe un 1 en el bit 4 del registro REFCN, esto le indica al LMP91000 que la polaridad del potencial que será inyectado a la celda electroquímica será positiva.

SetBias(bias)

```
void LMP91000::setBias(uint8_t bias) const
{
    unlock();
    uint8_t data = read(LMP91000_REFCN_REG);
    data &= ~(0x0F); //limpia bits [0:3]
    data |= bias; // escribe en bits [0:3]
    write(LMP91000_REFCN_REG, data);
}
```

Fig. 23 Función que establece el potencial de la celda, esta fija un porcentaje del potencial de referencia.

La función en la figura 23 le indica al potencióstato el porcentaje del potencial de referencia que se desea en la celda electroquímica. De acuerdo con el número colocado como bias, será el potencial en función del potencial de referencia, véase tabla 6.

Tabla 6 Valores decimales para establecer el valor del potencial de celda en función del voltaje de referencia.

0 - 0%	7 - 12%
1 - 1%	8 - 14%
2 - 2%	9 - 16%
3 - 4%	10 - 18%
4 - 6%	11 - 20%
5 - 8%	12 - 22%
6 - 10%	13 - 24%

3.2.2.2 Convertidor analógico digital.

El ADC es necesario para digitalizar la salida analógica obtenida del LMP91000. En el diseño propuesto se utiliza el chip ADS1115 de TI que posee cuatro canales simples o dos diferenciales de 16 bits cada uno.

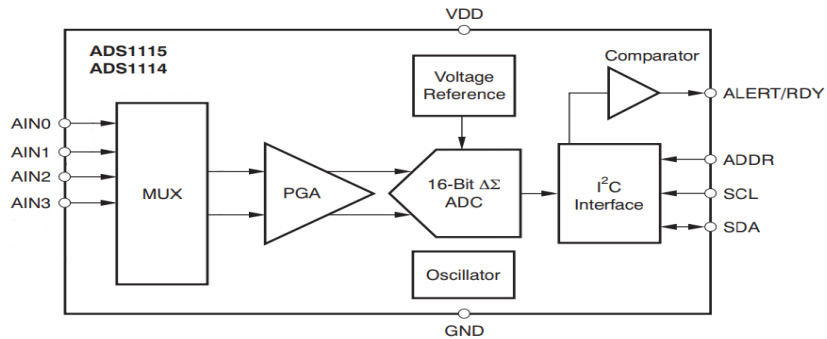


Fig. 24 Diagrama de bloques ADS1115 [86].

El ADS1115 posee una referencia interna con un valor de ± 4.096 V, como se ve en el diagrama de bloques de la figura 24. Con el fin de flexibilizar el rango de voltajes que opera el dispositivo, se integró un amplificador de ganancia programable (PGA, por sus siglas en inglés) que divide al voltaje de referencia interno, dando lugar a seis diferentes escalas que se enlistan en la tabla 7. El hecho de que el ADC posea diferentes rangos de voltaje facilita su implementación, dado que se puede conocer que potenciales se pueden medir en cada ganancia.

Tabla 7 Escala completa debida a PGA.

PGA	Rango (± 4.096 V/PGA)
2/3	± 6.144 V
1	± 4.096 V
2	± 2.048 V
4	± 1.024 V
8	± 0.512 V
16	± 0.256 V

La configuración del ADS1115 se realiza también mediante comunicación I²C. Este dispositivo posee un pin de dirección (ADDR) que configura la dirección dependiendo donde se conecte, ya sea GND (0x48), VDD (0x49), SDA (0x4A) o SCL (0x4B) dándole un total de cuatro direcciones a seleccionar. Este dispositivo, durante la comunicación solo puede ser esclavo, pero puede transmitir o recibir, si el maestro así lo requiere.

El ADS1115 cuenta con un registro apuntador que le permite moverse a los demás registros, una vez que se le escribe una dirección esta no cambia, por lo que el registro debe ser modificado cada que sea necesario acceder a una dirección diferente a la que se configuró anteriormente.

Escritura: Se envía la dirección del dispositivo y el bit de escritura en alto, cuando el dispositivo reconoce la instrucción se envía la información a escribir en el registro de configuración.

Lectura: Se envía la dirección del dispositivo y el bit de escritura en alto, cuando el dispositivo reconoce la instrucción y acto seguido envía la información disponible en el registro al que esté apuntando el registro apuntador.

Conexión con LMP91000.

Como se mencionó en la descripción, el LMP91000 tiene un cero interno programable que puede ser del 20%, 50% y 67% del voltaje de referencia. Para la aplicación de este trabajo, se seleccionó un voltaje externo de 5 V a fin de poder obtener una resolución de 100 mV y un cero del 20% (equivalente a 1 V). En la ecuación (3.15) se muestra el voltaje de salida del potenciómetro.

$$V_{OUT} = R_{TIA}I_{WE} + \text{Cero interno} \quad (3.15)$$

Donde:

R_{TIA} = Resistencia de ganancia del amplificador de transimpedancia

I_{WE} = Corriente en el electrodo de trabajo

Dado que el ADS1115 puede ser utilizado de manera diferencial, se conectó la salida de voltaje analógico del potencióstato al canal A0 del ADC. Así mismo se colocó en A1 una referencia de voltaje de 1V. De esta manera se resta el cero interno del potencióstato y en consecuencia el ADC solo mide el aumento de voltaje proporcional a la corriente que se está generando en el electrodo de trabajo (WE). La figura 25 muestra los potenciales conectados a los canales analógicos del ADS1115.

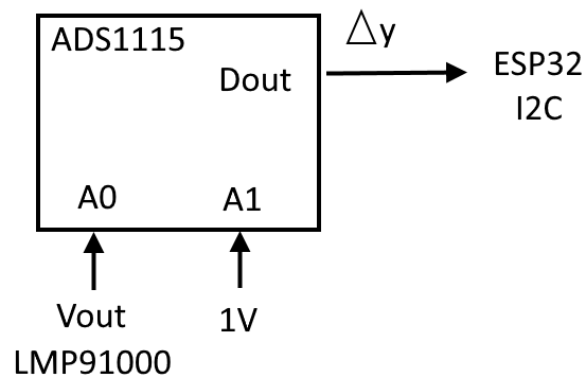


Fig. 25 Conexiones en modo diferencial en el ADS1115.

Programación del Convertidor analógico digital.

La dirección I²C que viene por defecto en el ADS1115 es 0x48, ya que esta es la misma que la del potencióstato y como el ADC posee cuatro direcciones, la mejor opción es colocar el pin de dirección a VDD y tener 0x49 como nueva dirección. En cuanto a la programación, como en el caso del potencióstato, la plataforma de Arduino también cuenta una librería para la configuración del ADS1115 [96]. Se verificó con la hoja de datos del ADC que funcionara de acuerdo a las instrucciones del fabricante, con respecto a la comunicación y la escritura en los registros y se encontró congruente. De las funciones disponibles solo se utilizaron las siguientes:

- *setgain()* :esta función establece la ganancia programable que dividirá a la referencia de voltaje interna.
- *begin()*: con esto se inicia la comunicación I²C que en Arduino se conoce como Wire.
- *readADC_Differential_0_1()*: con esta instrucción se le dice al ADC que se utilizará de modo diferencial y se tomará la señal en el canal A0 y se le restará el valor en el canal A1.

Begin()

```
void Adafruit_ADS1015::begin() { Wire.begin(); }
```

Esta función simplemente inicia la comunicación I²C en la tarjeta de adquisición de datos del ESP32.

Setgain(gain)

```
typedef enum { // define un tipo de dato
  GAIN_TWOTHIRDS = ADS1015_REG_CONFIG_PGA_6_144V,
  GAIN_ONE = ADS1015_REG_CONFIG_PGA_4_096V,
  GAIN_TWO = ADS1015_REG_CONFIG_PGA_2_048V,
  GAIN_FOUR = ADS1015_REG_CONFIG_PGA_1_024V,
  GAIN_EIGHT = ADS1015_REG_CONFIG_PGA_0_512V
  GAIN_SIXTEEN = ADS1015_REG_CONFIG_PGA_0_256V
} adsGain_t; // se define el tipo de dato ganancia de ads1115
```

Fig. 26 Valores de ganancia variable.

```
void Adafruit_ADS1015::setGain(adsGain_t gain) { m_gain = gain; }
```

Con una sola línea se coloca el valor de la ganancia que puede tomar los valores descritos en la tabla 7 (2/3, 1, 2, 4, 8 y 16).

ReadADC_Differential_0_1()

La función en la figura 24 le indica al ADS1115 que la medición se realizará de manera diferencial, esta configuración es útil si se recuerda la forma de conexión del ADC con el potenciómetro LMP91000. Ya que el LMP91000 tiene un offset de 1 V, el ADC en modo diferencial puede eliminarlo al colocar una referencia de 1 V en el canal A1 que con esta función es negativo. Es decir, se restará al valor en el canal A0 que es donde se encuentra conectado el voltaje de salida analógico del LMP91000.

```
int16_t Adafruit_ADS1015::readADC_Differential_0_1() {
  uint16_t config = // Inicia con valores defecto
    ADS1015_REG_CONFIG_CQUE_NONE | // Deshabilita el comparador
    ADS1015_REG_CONFIG_CLAT_NONLAT | // No-latching
    ADS1015_REG_CONFIG_CPOL_ACTVLOW | // Alert/Rdy bajo
    ADS1015_REG_CONFIG_CMODE_TRAD | // Comparador tradicional
    ADS1015_REG_CONFIG_DR_1600SPS | // 1600 muestras por segundo
    ADS1015_REG_CONFIG_MODE_SINGLE; // Modo una sola medición
  config |= m_gain; // Establece la ganancia (rango de voltaje)
  config |= ADS1015_REG_CONFIG_MUX_DIFF_0_1; // A0 = Positivo, A1 = Negativo (A0 - A1)
  config |= ADS1015_REG_CONFIG_OS_SINGLE;
  // Escribe en el registro de configuración
  writeRegister(m_i2cAddress, ADS1015_REG_POINTER_CONFIG, config);
  delay(m_conversionDelay); // Esperar a que la conversión termine
  uint16_t res = // Leer los resultados de la conversión en el registro
    readRegister(m_i2cAddress, ADS1015_REG_POINTER_CONVERT) >> m_bitShift;
  if (m_bitShift == 0) {
    return (int16_t)res;
  } else {
    if (res > 0x07FF) {
      res |= 0xF000;
    }
    return (int16_t)res;
  }
}
```

Fig. 27 Función para leer de manera diferencial el potencial en el ADC.

3.2.2.3 Tarjeta de adquisición.

La adquisición de datos estará constituida por la tarjeta ESP32 (véase figura 28). El ESP32 es un microprocesador de 32 bits con dos núcleos, cuenta ya con comunicación Wi-Fi y bluetooth integrada, la frecuencia del reloj puede elevarse hasta 240 MHz y posee 512 kB de memoria RAM. La tarjeta que se está utilizando tiene 30 pines y soporta el

protocolo de comunicación serial I²C con una señal lógica de 3.3 V. La programación de este microcontrolador se realiza mediante la plataforma de Arduino

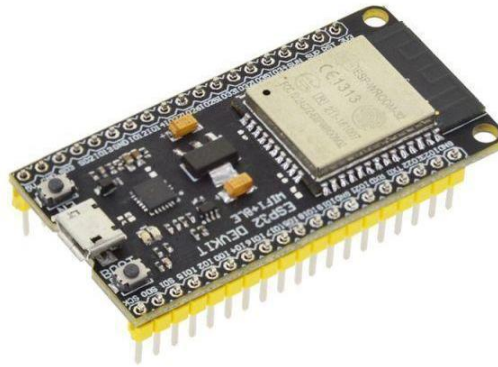


Fig. 28 Tarjeta de desarrollo implementada por Espressif Systems con el microcontrolador ESP32.

Programación en la tarjeta de adquisición.

En el caso de una medición de amperometría se necesita establecer algunos parámetros tales como:

- El potencial que se aplicará a la celda. En este caso particular se utilizaron los voltajes: 0.3 V y 0.4 V.

Para saber el porcentaje de 5 V equivalente a 0.3 V y 0.4 V se realiza lo siguiente:

$$\text{Porcentaje} = \frac{0.3 \text{ V} * 100}{5 \text{ V}} = 6\% \quad (3.16)$$

$$\text{Porcentaje} = \frac{0.4 \text{ V} * 100}{5 \text{ V}} = 8\% \quad (3.17)$$

De las ecuaciones (3.16) y (3.17) y de acuerdo a los valores de la tabla 6, los porcentajes 6% y 8% equivalen a 4 y 5 respectivamente en la función setBias(bias) vista en la programación del potenciómetro LMP91000.

- El tiempo que durará el experimento. Definido en 550s para todos los procedimientos de esta tesis.
- La frecuencia con la que se tomarán mediciones: Establecido cada 0.5 s.

Para lograr que las mediciones sean cada 0.5 segundos se utiliza una interrupción por temporizador. El temporizador se configura cada 500,000 μs con un reloj base de 80 MHz, de esta forma la interrupción sucederá cada 0.5 s y es cuando el ESP32 solicitará al ADC que realice una medición del potencial que le esté enviando el LMP91000.

La programación del ESP32 se colocará por secciones, primero la correspondiente al *setup* que solo ocurre una vez y después la que se integró en las interrupciones de *timer*. Finalmente, la sección del programa que se ejecuta durante el experimento de amperometría.

Configuración.

En la figura 29 se presenta el diagrama de flujo que indica los parámetros a configurar tanto en el LMP91000 como en el ADS1115. Para el primero se establece una configuración de tres electrodos para que opere con el SPE, se coloca una ganancia de 7 $\text{k}\Omega$ en el módulo de transimpedancia, se elige una fuente externa de voltaje de referencia y se coloca el cero interno del potencióstato al 20% de esa referencial. En cuanto al ADC se establece una ganancia de 16, con lo que se tendrá un rango de potencial de ± 0.256 V. Así mismo se inician los protocolos de comunicación serial, que se tendrá con la interfaz de usuario, e I²C que en Arduino se denomina *Wire*. Y del mismo modo, se configura el temporizador para que se interrumpa cada 0.5 s, sin activar en este punto la interrupción.

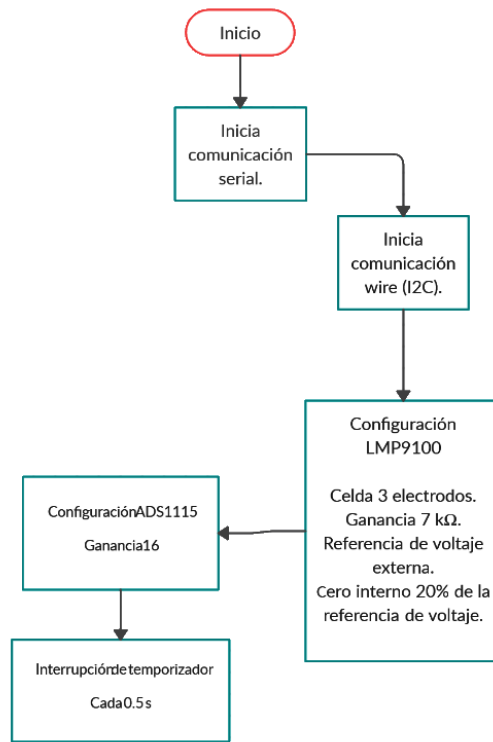


Fig. 29 Diagrama de flujo de la configuración de LMP91000 y ADS1115 dentro de la programación del ESP32.

Interrupción de temporizador.

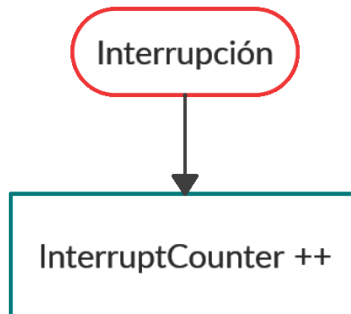


Fig. 30 Diagrama de flujo de la interrupción por temporizador en el ESP32.

En el diagrama que se muestra en la figura 30, se utiliza a la variable global *interruptCounter* como una bandera que indica que ocurrió una interrupción. En el programa principal se tendrá el contador principal de interrupciones. Este debe llegar a 1100, ya que las mediciones se realizan cada medio segundo y los experimentales son de 550 s el contador debe llegar al doble para que las mediciones terminen y el ESP32 se quedé a la espera de un nuevo experimento.

Programa principal.

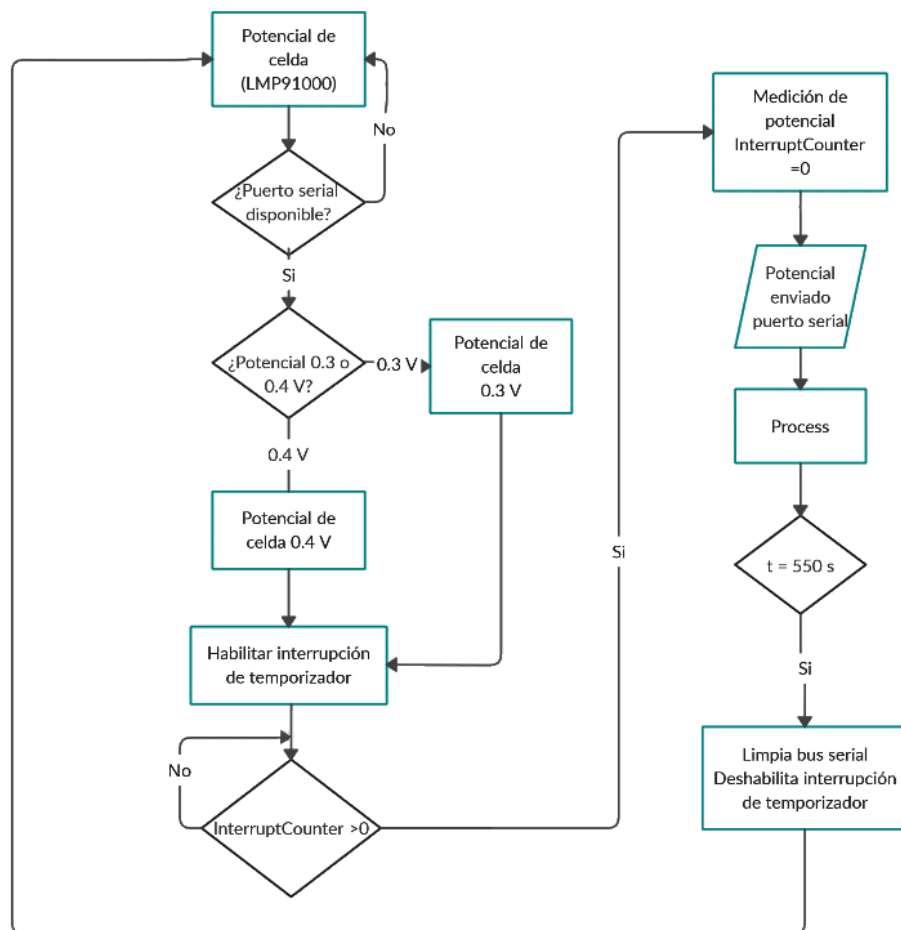


Fig. 31 Diagrama de flujo del programa principal.

El diagrama que se muestra en la figura 31 muestra el flujo que toma el programa principal. Inicia colocando el potencial de la celda en 0 V mientras espera la señal de inicio proveniente de la interfaz por medio del puerto serial. Cuando la interfaz en LabVIEW inicia, envía el potencial a utilizar (ya sea 0.3 o 0.4 V) y a su vez el ESP32 envía instrucciones al LMP91000 para cambiar el potencial de celda. En esta parte del programa es cuando se habilitan las interrupciones de temporizador y se espera a que la bandera *InterruptCounter* sea mayor de 0, ya que esto indicaría que ya pasaron 0.5 s desde la última interrupción. Es cada 0.5 s cuando se realizan las mediciones de potencial, el ESP32 indica al ADS1115 que una medición de potencial diferencial entre los canales A0 y A1 se debe realizar y cuando el ADC envía esta medición el microcontrolador la envía a la interfaz. Se coloca un contador de tiempo t que indica cuánto tiempo ha pasado desde que se inició el experimento, cuando esta variable llega a 550 el programa se detiene y regresa a esperar otro inicio de experimento desde la interfaz de usuario.

3.2.2.4 Interfaz de usuario.

La interfaz de usuario se desarrolló con el software LabVIEW 2019® para presentar los datos de amperometría de forma gráfica. Para iniciar se lee el puerto serial donde se encuentra el ESP32, la tarjeta de adquisición espera una señal para iniciar las mediciones. Cuando se inicia el experimento el microcontrolador envía los datos del convertidor analógico digital y estos son graficados y almacenados en un archivo .csv para su posterior análisis. El programa desarrollado en LabVIEW se muestra en la figura 32. El flujo de un programa en LabVIEW siempre es de izquierda a derecha, es decir, las primeras instrucciones a ejecutarse serán las que están en el extremo izquierdo y las últimas las del extremo derecho. En este sentido lo primero que hace el programa es abrir el puerto serial donde se encuentra el ESP32 y enviarle la señal de inicio. Paralelamente abre o crea el documento indicado por el usuario. En seguida se coloca en modo amperometría y se leen los datos que envía el ESP32 al serial: tiempo y potencial. Estos

se dividen y se convierten a número, debido a que el ESP32 envía los datos en formato ASCII. El programa convierte la cadena de caracteres a números y con estos realiza la operación de división entre la ganancia.

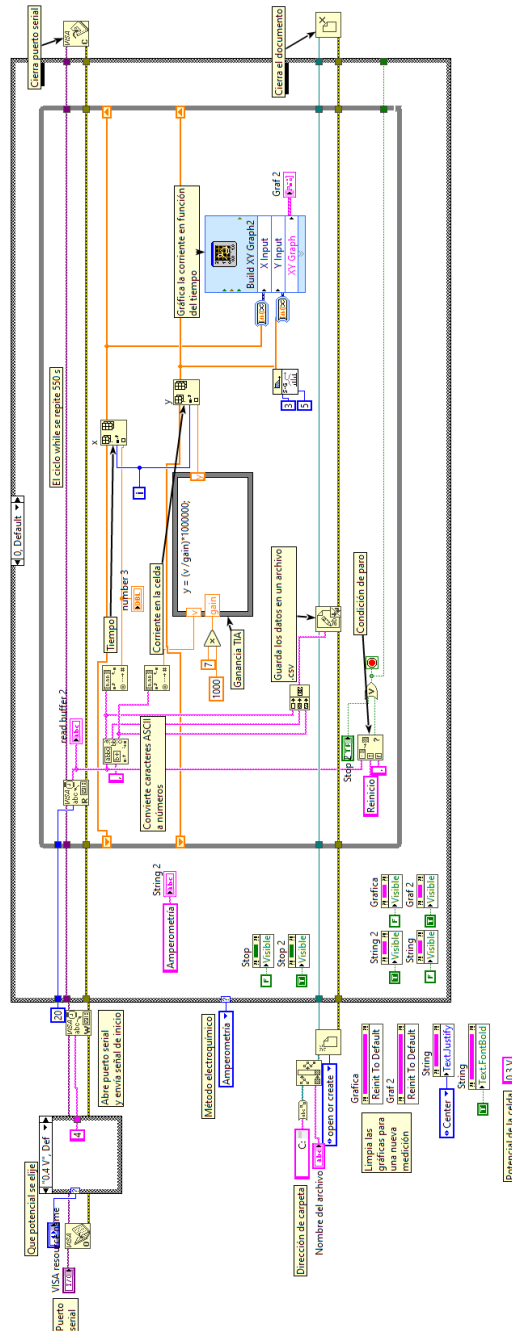


Fig. 32 Programación a bloques desarrollada en LabVIEW 2019

La figura 33 muestra la apariencia de la interfaz final de usuario del potencióstato desarrollado empleando el LMP91000. Desde esta interfaz es posible elegir el potencial que será aplicado al sensor, ya sea 0.3 V o 0.4 V. También es posible elegir el nombre del archivo que guardará la información. Se debe elegir el puerto serial donde está conectado el ESP32, para que la comunicación entre éste y la interfaz se establezca. En el anexo C de este trabajo se incluye un manual de usuario de la interfaz programada.

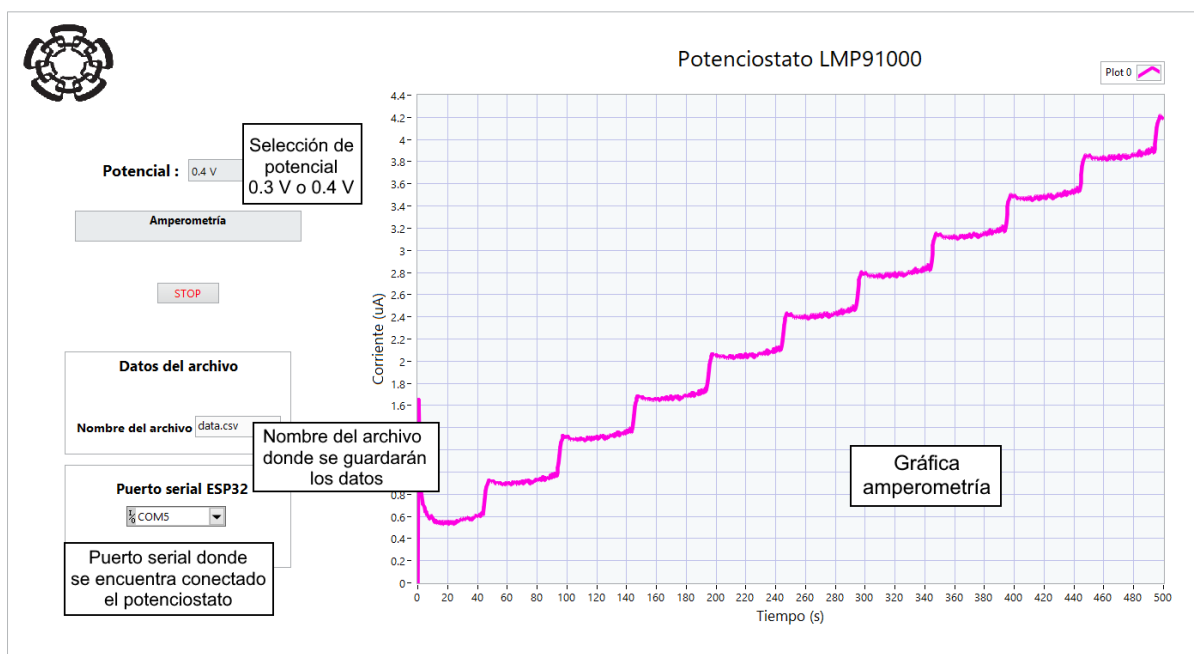


Fig. 33 Interfaz del potencióstato LMP91000.

3.2.2.5 Diseño del circuito impreso

Esta aplicación consta de una sola PCB, cuyo diseño esquemático se muestra en la figura 34. La instrumentación se alimentará con un voltaje externo, el cual será puesto en 5V con ayuda de un regulador de voltaje fijo al mismo potencial. El diseño esquemático y el de la placa de cobre se realizaron en el software EAGLE 9.5.2 de Autodesk. Para la conexión entre el potencióstato y el ADC se utiliza el bus de comunicación del ESP32,

ambos dispositivos necesitan de resistencias de *pull up* en los buses SCL y SDA, por lo que se colocaron dos resistencias de 10 kΩ a los 3.3 V del ESP32.

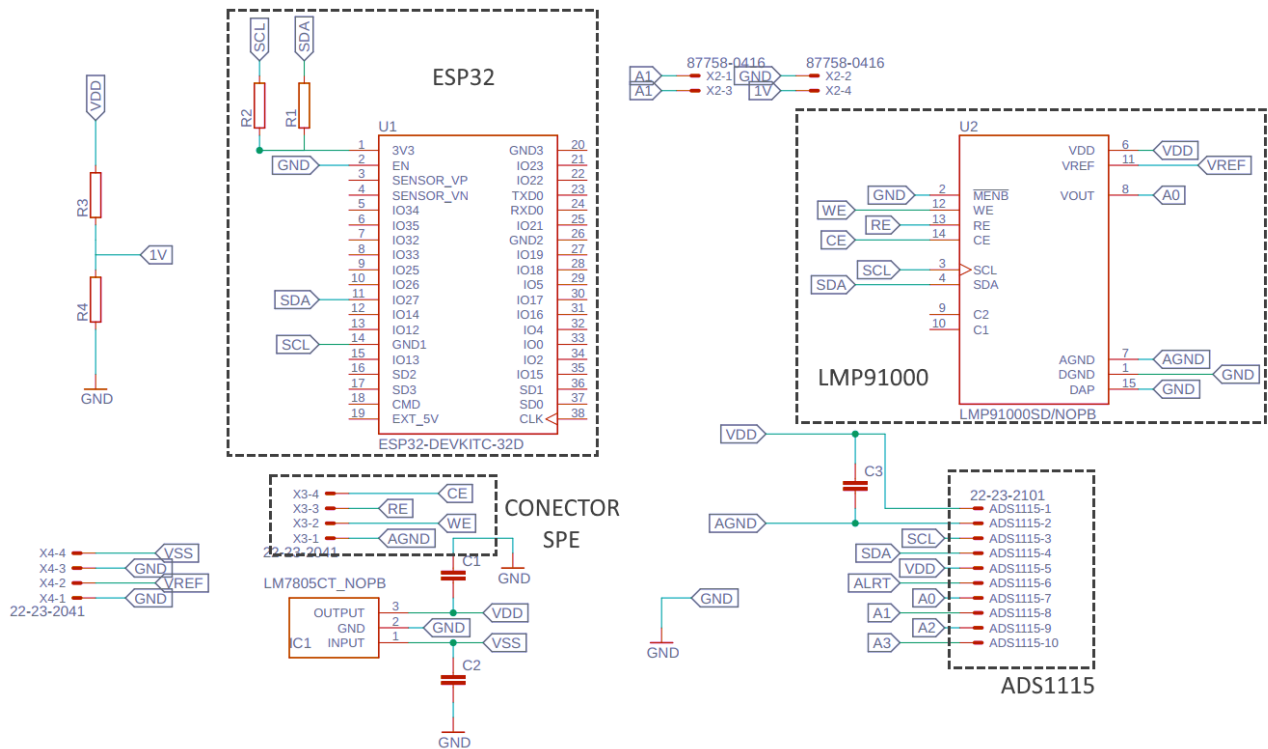


Fig. 34 Esquemático de la instrumentación para el potencióstato.

En la descripción del LMP91000 se mencionó que tiene un pin llamado MENB, que habilita la comunicación con el potencióstato. En esta aplicación el pin correspondiente a la activación del LMP91000 se pondrá a tierra para garantizar que la comunicación esté siempre habilitada (véase figura 35).

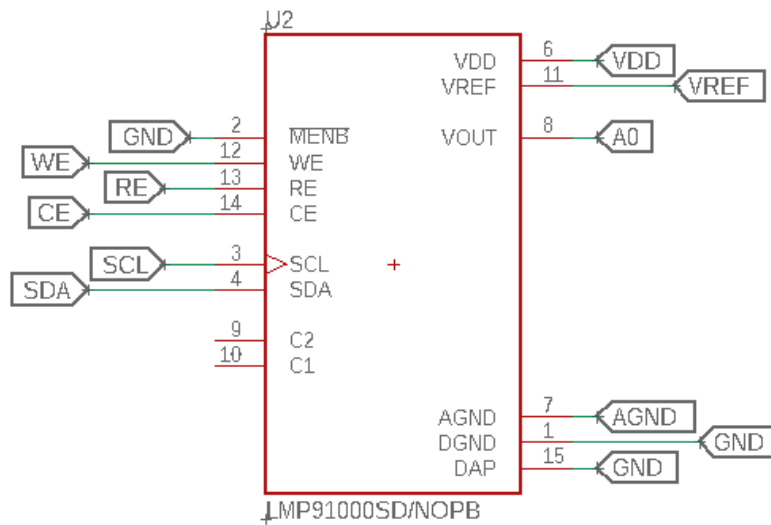


Fig. 35 Conexiones electrónicas del LMP91000.

En la hoja de datos del ADS1115 se describe la necesidad de un capacitor de un valor de $0.1 \mu\text{F}$ conectado del pin de alimentación a tierra, debido a que cuando el ADS1115 se encuentra realizando una conversión toma pequeños picos de corriente de la alimentación, el capacitor de $0.1 \mu\text{F}$ suministra estos pequeños picos [86].

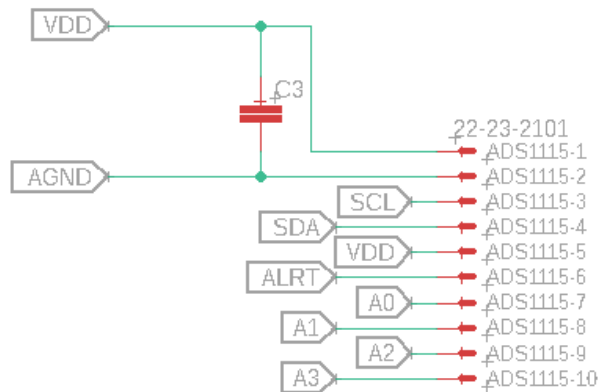


Fig. 36 Configuración electrónica del ADS1115.

Conexiones del sistema

El sistema diseñado se alimentó con una fuente conmutada comercial marca Weidmüller, la cual tiene una salida de voltaje de 9 V con una corriente de 3.5 A. Como medida preventiva ante las señales interferentes, se separaron las tierras analógicas de las digitales. Las conexiones eléctricas de los diferentes componentes del sistema se muestran en la figura 37. Las conexiones en naranja son las correspondientes a tierras analógicas, mientras que el color negro son tierras digitales.

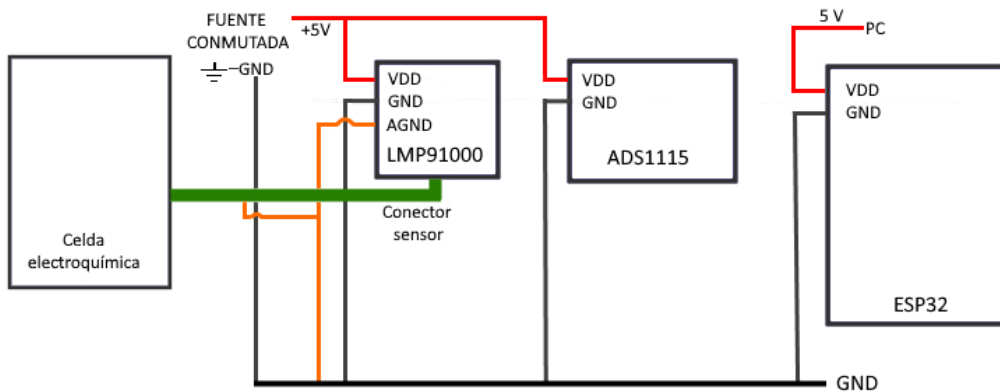


Fig. 37 Diagrama de conexiones eléctricas.

Para asegurar una respuesta confiable por parte del potencióstato desarrollado, se realizaron detecciones amperométricas utilizando cinco de las siete ganancias disponibles en el LMP91000 (2.75 K Ω , 3.5 K Ω , 7 K Ω , 14 K Ω y 35 K Ω), y comparando los resultados obtenidos utilizando el 910 PSTAT mini de Metrohm.

3.2.2.6 Diseño de carcasa

La electrónica desarrollada se introdujo en una carcasa diseñada en el software de SolidWorks 2019. La caja se imprimió con una impresora 3D de la marca Ender 3

(Creality), utilizando un filamento ABS transparente con un diámetro de 1.75 mm. En la figura 38 se presenta el diseño final, que incluye cinco borneras para la conexión del SPE y la alimentación del circuito. También se añadió un recuadro para la conexión del cable USB mediante el cual el sistema se comunica con la interfaz de LabVIEW.

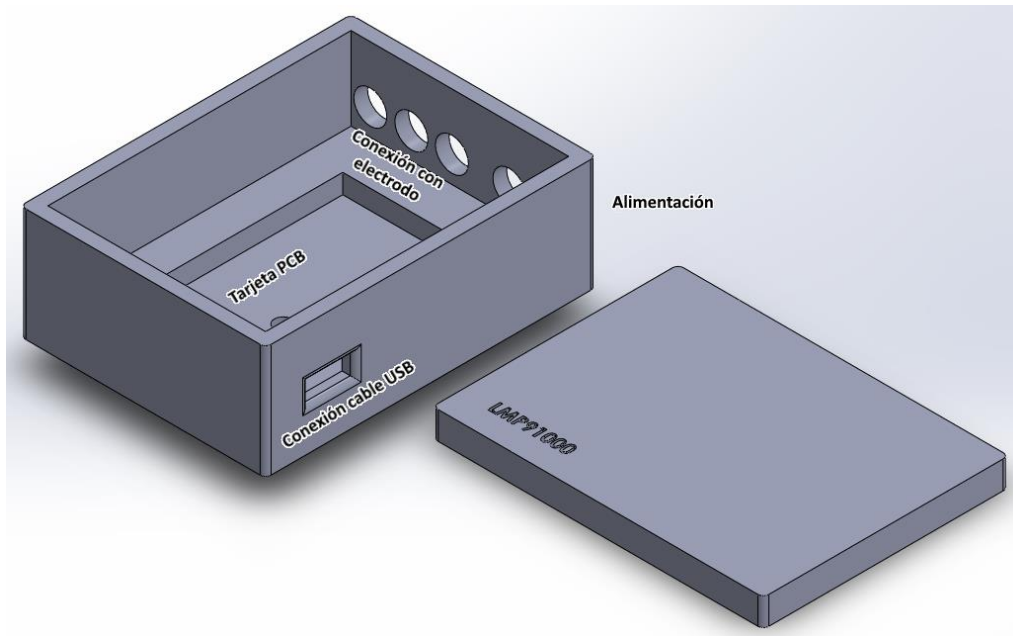


Fig. 38 Diseño en 3D de la carcasa para el potenciostato desarrollado.

En la figura 39 se muestra la vista isométrica de la carcasa, en esta se observan las borneras para el sensor y para la alimentación. En el caso de las conexiones para el sensor, estas se colocaron de colores distintos para evitar errores de conexión de la celda. De igual manera los colores de la alimentación se pensaron para evitar posibles confusiones.

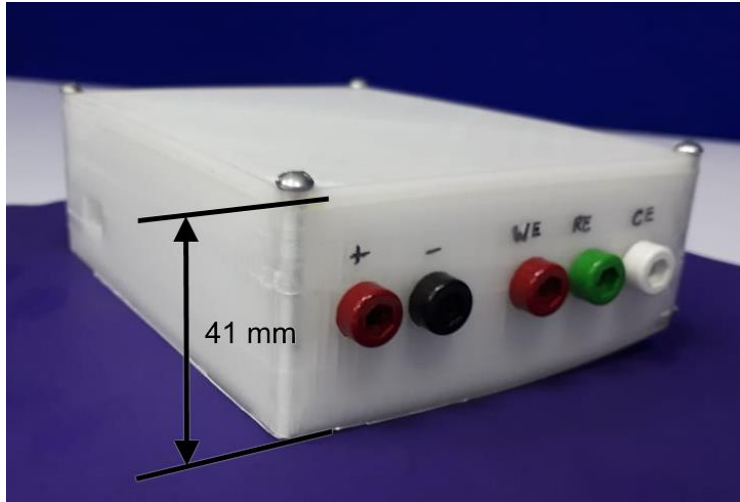


Fig. 39 Vista Isométrica de la carcasa impresa del potenciostato desarrollado.

En la figura 40 se presentan las conexiones entre la placa y los conectores para el electrodo y para alimentación. Mientras que en la figura 41 se presenta la tapa de la carcasa.

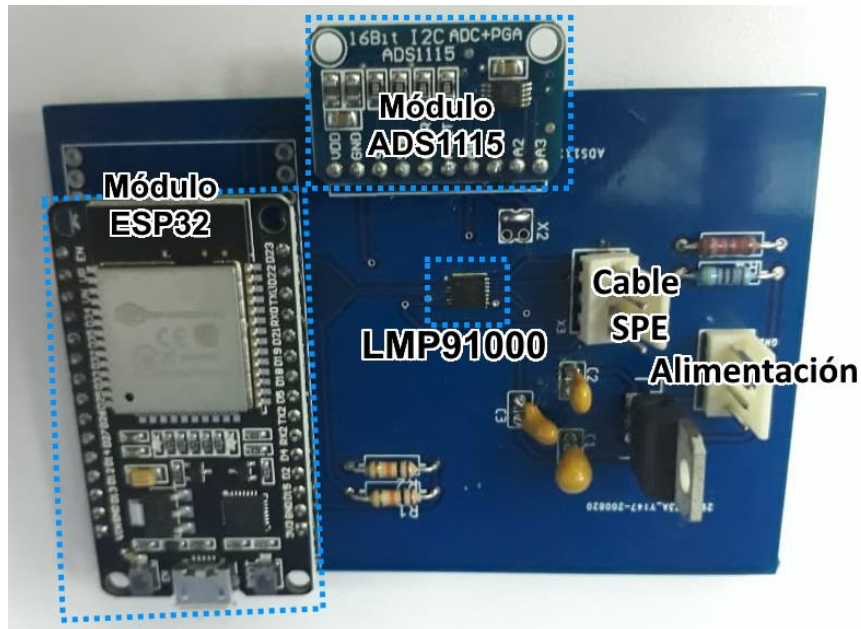


Fig. 40 Placa de cobre del potenciostato LMP91000.

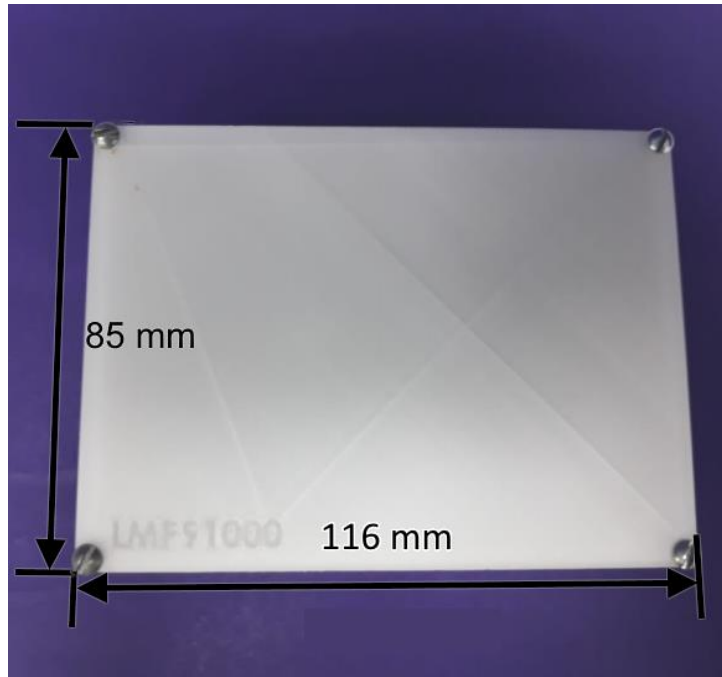


Fig. 41 Tapa de la carcasa del potencióstato desarrollado.

Capítulo 4.

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de la caracterización electroquímica mediante VC realizada al SPE en sus diferentes etapas de modificación: sensor serigrafiado de carbón (SPE), sensor activado(aSPE) y sensor serigrafiado de carbón con nanopartículas de oro (SPE-AuNPs). Así mismo, se comparan las amperometrías realizadas con estos electrodos utilizando la instrumentación desarrollada con la respuesta obtenida con el potenciostato comercial 910 PSTAT mini de Metrohm.

4.1 Caracterización del sensor desarrollado.

4.1.1 Caracterización superficial y electroquímica de la superficie.

Caracterización superficial.

Para caracterizar los cambios superficiales al sensor se obtuvieron imágenes en un microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés). Esto se hizo con el fin de comprobar que el proceso de electrodeposición produjo nanoestructuras en la superficie del SPE-AuNPs, así como la morfología asociada a la distribución y las dimensiones obtenidas. La figura 42 presenta las micrografías adquiridas a partir de un escaneo a diferentes aumentos. La primera imagen a 5000x (fig. 42A) muestra que las nanopartículas se encuentran distribuidas de forma regular sobre la superficie del electrodo sin que existan grandes aglomeraciones. Un acercamiento a 10000x (fig. 42B) comprueba que existen fracturas en la superficie, presumiblemente inducidas durante el proceso de pretratamiento o activación [73]. Finalmente, las imágenes a 20000x (fig. 42C) muestran las dimensiones de las nanopartículas de oro obtenidas, con tamaños variados que van desde 83 nm hasta 56 nm. Al respecto, es importante mencionar que entre más pequeña sea la partícula, mayor será la actividad catalítica, ya que las partículas pequeñas tienen un gran porcentaje de átomos superficiales y por ello un mayor número

de átomos de oro está en contacto con el soporte [97]. Estas afirmaciones deberán verse reflejadas en el comportamiento electroquímico del SPE-AuNPs al comparar las respuestas del aSPE con la del SPE, esperando que la señal del SPE-AuNPs presente un incremento significativo de intensidades sobre los otros dos electrodos, debido a que la modificación que se realizó resultó en partículas de orden nanométrico.

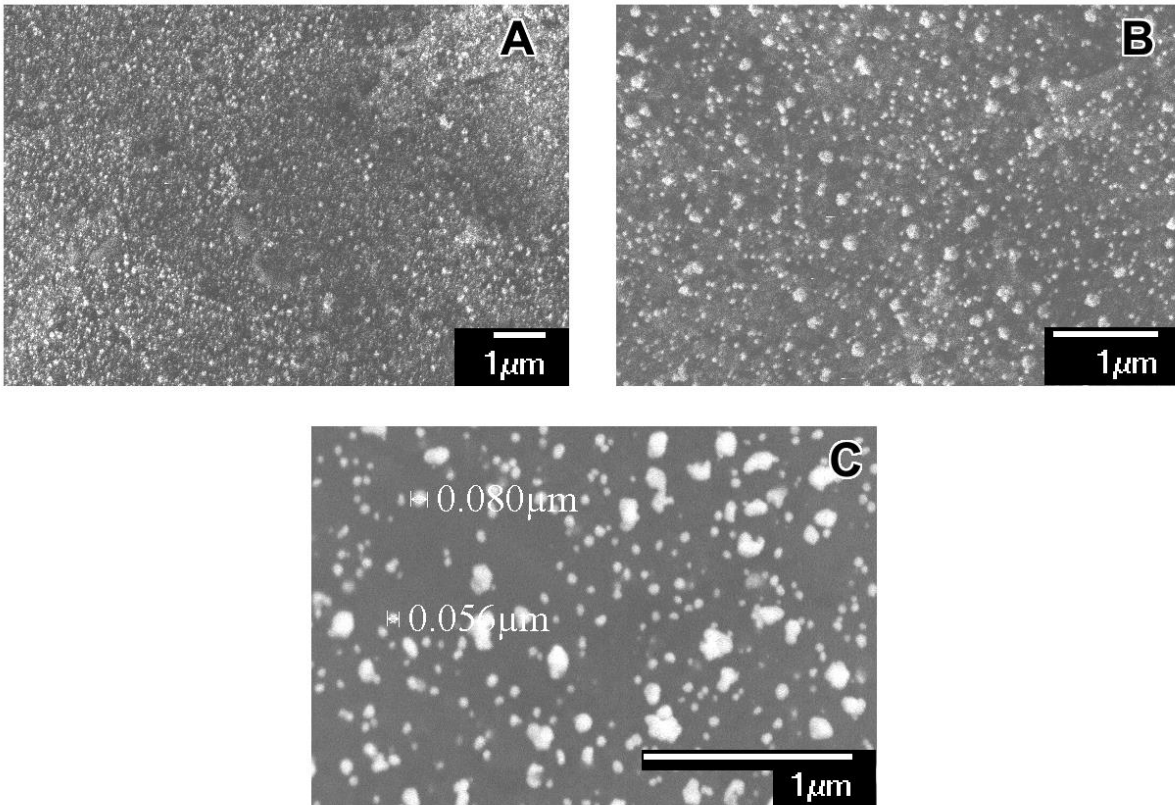


Fig. 42 Micrografía SEM de la superficie del electrodo de carbón serigrafiado con nanopartículas de oro. (A) Imagen con un aumento de 5000. (B) Imagen con un aumento de 10000. (C) Imagen con un aumento de 20000.

Caracterización electroquímica.

De las VC realizadas en $[\text{Fe}(\text{CN}_6)]/\text{KCl}$ se obtuvo el voltamograma presentado en la figura 43. En la línea de color azul se muestra el comportamiento del SPE ante el par redox utilizado, en comparación con los electrodos obtenidos de la fase de activación y adición de nanopartículas de oro descritas anteriormente. Los picos de oxidación y reducción brindan información acerca del potencial necesario para que el electrodo oxide o reduzca el analito de interés [37]. En este sentido la diferencia entre el potencial de oxidación y el de reducción está asociado con el mecanismo de reacción en la superficie, la velocidad del mismo y su efectividad [98]. Una forma cuantitativa de evaluar esto es mediante la diferencia en mV de los potenciales de oxidación y reducción, los cuales deben reducirse mientras más efectiva resulte la superficie modificada. Otro parámetro a considerar es el valor de las corrientes de oxidación y reducción, las cuales tenderán a aumentar en caso de que el electrodo muestre un mejor desempeño [74]. La diferencia entre los picos de oxidación y reducción en el SPE es de 170 mV. Mientras que las corrientes de oxidación y reducción tienen un valor de 69.600 μA y -90.182 μA , respectivamente.

En la figura 43 la línea continua de color negro representa la señal obtenida de la voltamperometría cíclica del aSPE. Esta respuesta presenta un aumento en los picos de oxidación y reducción de 10 mV en comparación con el SPE. Este pequeño aumento en el potencial que le toma al sensor oxidar y reducir el compuesto al que fue expuesto indica un posible aumento del área superficial debido al pretratamiento en PBS, lo que potencialmente reduciría la velocidad de la reacción [93]. A pesar del desplazamiento del pico de reducción a -0.01 V, las corrientes de oxidación y reducción son ahora mayores 71.983 μA y -93.096 μA respectivamente, lo cual es indicativo de que el carbón se encuentra más expuesto.

El comportamiento electroquímico del SPE-AuNPs, se muestra con la línea color magenta en la figura 43. Se puede observar una mejora en respuesta respecto de los otros dos sensores, no solo debido a que las corrientes de oxidación y reducción son visiblemente mayores, 79.9846 μA y -101.989 μA respectivamente, sino también a que la diferencia entre los picos de oxidación y reducción es de 140 mV. A partir de estos resultados es posible corroborar lo visto de manera superficial mediante el SEM, pues la presencia de nanopartículas de oro en la superficie de carbón del electrodo mejora la actividad catalítica de la superficie del electrodo hacia el $[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{KCl}$.

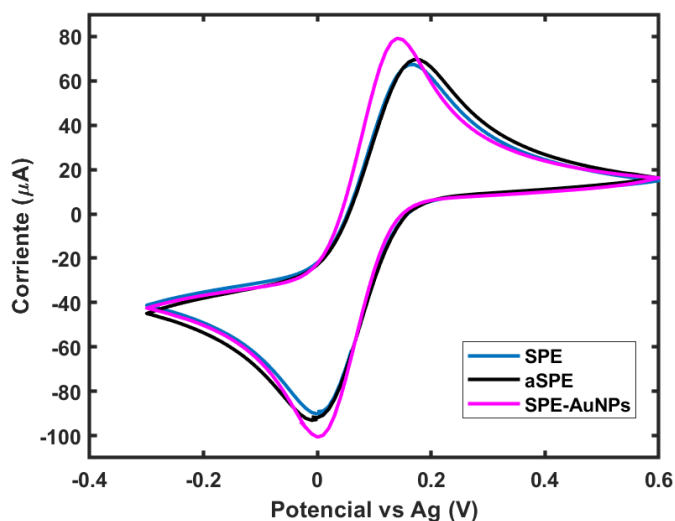


Fig. 43 Voltamperograma comparativo del par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{KCl}$ en el sensor de carbón serigrafiado desde el sustrato de carbón hasta la electrodeposición de nanopartículas de oro.

4.1.2 Caracterización por voltamperometría cíclica de la detección de ácido úrico.

En este apartado se discuten los resultados obtenidos mediante el análisis de VC orientado a la detección de AU diluido en PBS y en saliva artificial utilizando los sensores SPE y el SPE-AuNPs.

4.1.2.1 Sensor serigrafiado de carbón.

En primer lugar, se hicieron pruebas de sensado con el SPE a diferentes concentraciones de ácido úrico, obteniéndose las señales mostradas en la figura 44. De acuerdo con los voltamperogramas, el potencial de oxidación del AU en el SPE se encuentra en $+0.3560 \pm 0.0328V$. Esto es consistente con trabajos previos en donde se reporta la oxidación electroquímica de ácido úrico en un electrodo de carbón [60].

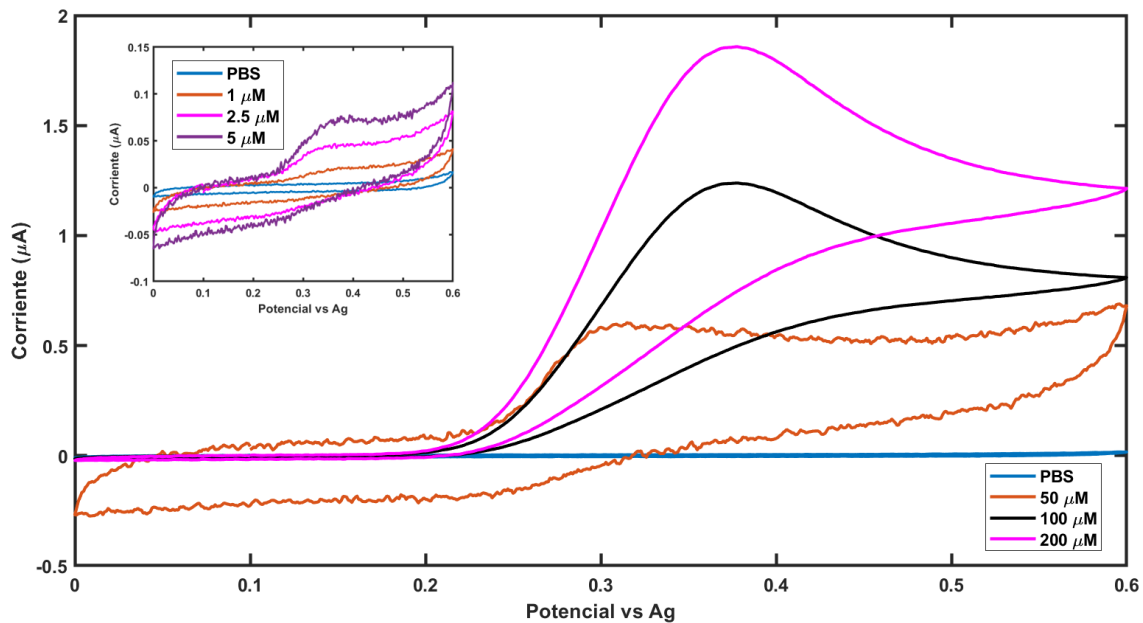


Fig. 44 Voltamperometría cíclica comparativa entre las concentraciones de ácido úrico diluidas en PBS y medidas en el SPE. En el inserto se muestran las concentraciones de 1, 2.5 y 5 μM .

En la figura 45 se puede observar la curva de calibración obtenida con el SPE antes las concentraciones probadas mediante VC, donde es posible notar que el aumento en corriente es proporcional al aumento de concentración.

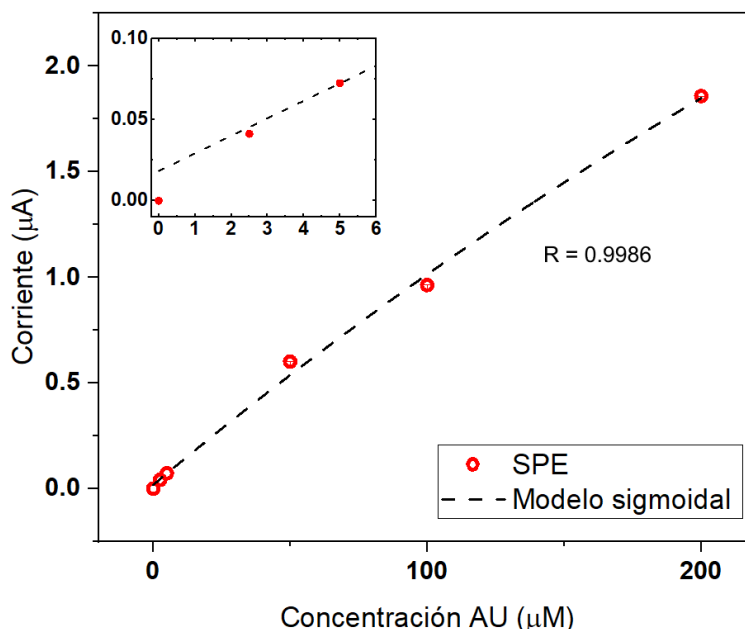


Fig. 45 Corriente en SPE obtenida mediante VC en función de la concentración y el modelado mediante una función sigmoideal. En el inserto de la gráfica se aprecia una versión ampliada de los primeros puntos de concentración asociados a 0, 2.5 y 5 µM en PBS.

En cuanto a la determinación de AU en saliva artificial, la figura 46 muestra el resultado de las pruebas de sensado, en este caso el potencial de oxidación de ácido úrico se encuentra en $+0.48 \pm 0.020V$. Este potencial de oxidación es 1.348 veces mayor que el potencial de oxidación en soluciones de PBS. Este efecto es posiblemente debido a la composición de la saliva artificial y a que esta presenta mayor densidad, motivo por el cual se ralentiza el intercambio electrónico, provocando que el AU necesite un voltaje superior para poder oxidarse en la superficie del SPE [98]. En la figura 47 se presenta la curva de calibración de las señales voltamperométricas, que muestra el aumento de corriente proporcional al aumento de concentración de manera lineal en el SPE.

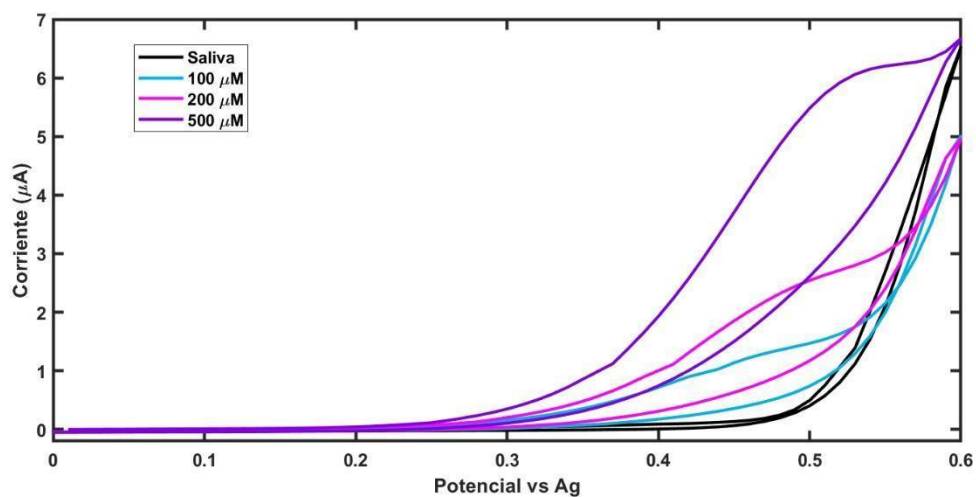


Fig. 46 Voltamperometría cíclica comparativa entre las concentraciones de ácido úrico diluidas en saliva artificial y medidas en el sensor serigrafiado de carbón.

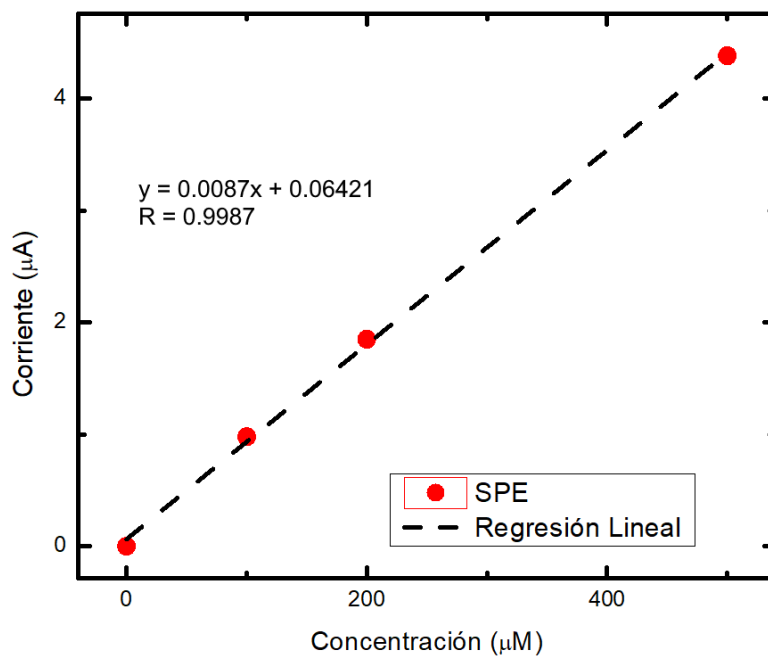


Fig. 47 Corriente en SPE obtenida mediante VC en función de la concentración en saliva artificial y el modelado lineal del comportamiento.

4.1.2.2 Sensor serigrafiado de carbón modificado con nanopartículas de oro.

Al igual que el caso del SPE, se realizaron pruebas de sensado con el SPE-AuNPs utilizando las mismas concentraciones de AU diluido en PBS. Los resultados obtenidos se pueden observar en la figura 48. En la gráfica, se aprecia que el potencial de oxidación de AU en la superficie del SPE-AuNPs se reduce a $0.2616 \pm 0.0326V$. Teniendo en cuenta que el potencial al que el AU se oxidaba en la superficie de carbón era de $0.3560 \pm 0.0328V$, existe entonces una disminución importante del potencial. Esto es indicativo de que el proceso de electrodeposición modificó la conductividad del electrodo favoreciendo el intercambio electrónico [61] debido a las propiedades catalíticas del oro y que por consiguiente el sensor requiere menor energía para realizar la detección [98].

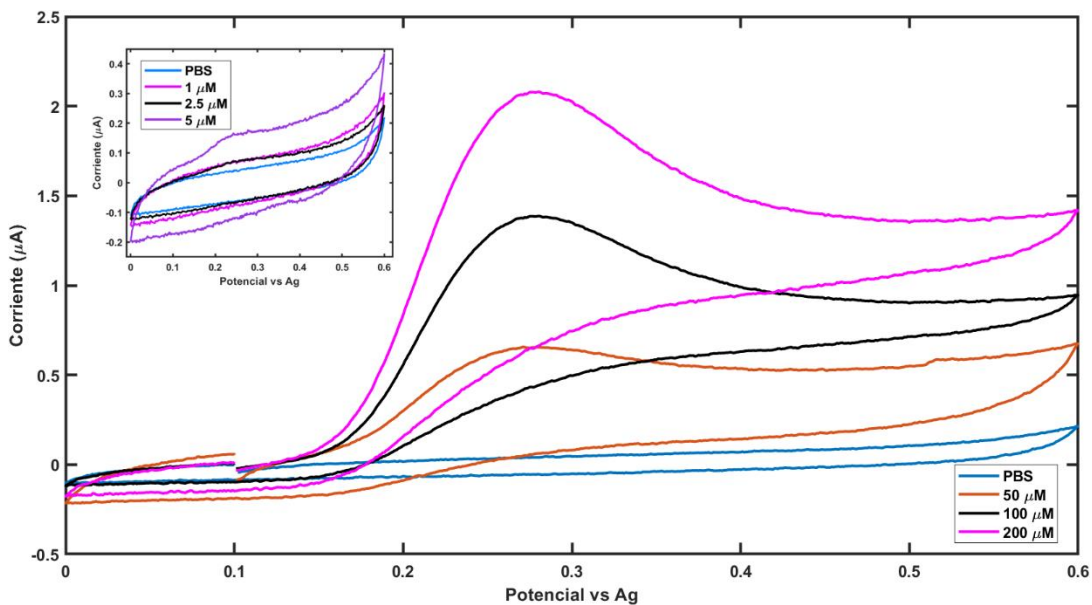


Fig. 48 Voltamperometría cíclica comparativa entre las concentraciones de ácido úrico diluidas en PBS y medidas en el sensor serigrafiado de carbón con nanopartículas de oro. En el inserto se muestran las concentraciones de 1, 2.5 y 5 µM.

En el SPE-AuNPs, al igual que en el SPE, la corriente de oxidación aumenta de manera proporcional a la concentración, en la figura 49 se presentan las corrientes en función de las concentraciones utilizadas en VC.

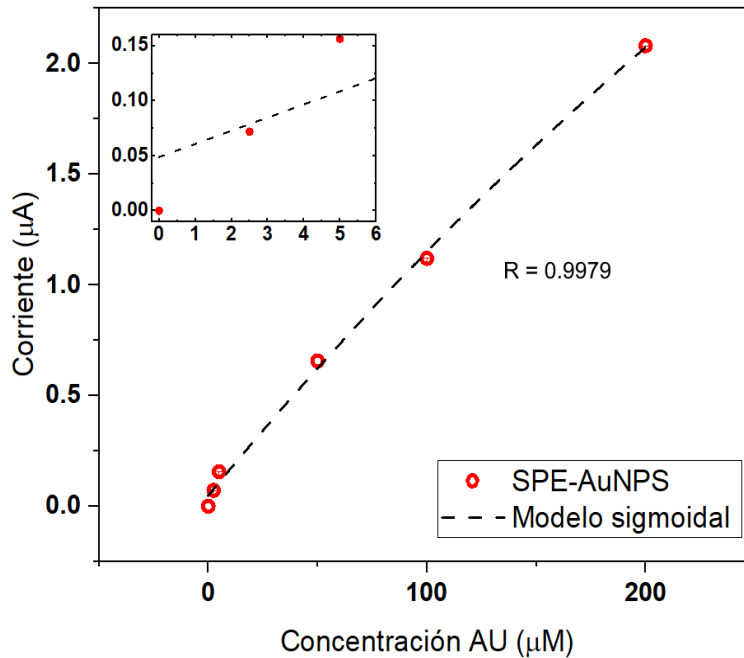


Fig. 49 Corriente en SPE-AuNPs obtenida mediante VC en función de la concentración de AU en PBS y el modelado mediante un polinomio de tercer grado de su comportamiento. En el inserto de la gráfica se aprecia una versión ampliada de los primeros puntos de concentración asociados a 0, 2.5 y 5 μM en PBS.

En relación a la determinación de AU en saliva artificial en la figura 50 se muestra el resultado de las pruebas realizadas, en esta ocasión el potencial de oxidación de ácido úrico se encuentra en $+0.383 \pm 0.030\text{V}$. Este potencial de oxidación es mayor al que se obtiene al realizar la detección en PBS. A pesar de esto ese potencial de oxidación en saliva es menor que el que se obtiene con el SPE, esto quiere decir que la superficie del SPE-AuNPs es capaz de oxidar de manera más eficiente el AU que el SPE aún en un medio que disminuye el intercambio electrónico. Estos resultados son alentadores ya que confirman que el comportamiento electroquímico obtenido está relacionado con la

inclusión de las nanopartículas de oro sobre la superficie de carbón. Adicionalmente se modeló el comportamiento de la corriente en función de las concentraciones en la figura 51. Se muestra entonces que al igual que el SPE el comportamiento del SPE-AuNPs es lineal en un rango de 0 a 500 μM con una sensibilidad mayor que la del SPE.

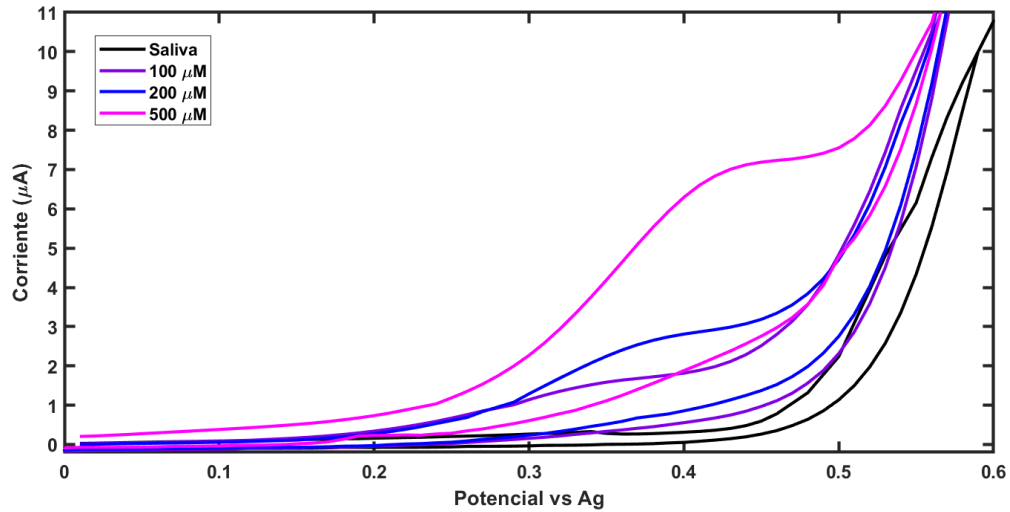


Fig. 50 Voltamperometría cíclica comparativa entre las concentraciones de ácido úrico diluidas en saliva artificial y medidas en el sensor serigrafado de carbón con nanopartículas de oro.

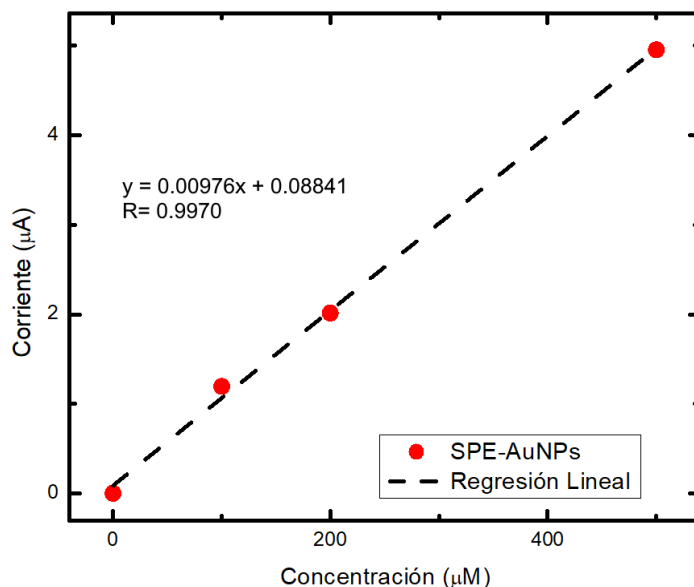


Fig. 51 Corriente en SPE obtenida mediante VC en función de la concentración en saliva artificial y el modelado lineal del comportamiento.

Comparaciones cuantitativas entre ambos electrodos.

En la figura 52 se muestra la comparativa entre el SPE y el SPE-AuNPs a 200 µM de AU. En este caso es claramente visible la diferencia de potenciales de oxidación que se comentaron anteriormente. Se observa también un aumento en la respuesta de corriente del SPE-AuNPs en comparación con el SPE. Mientras que el SPE entrega una corriente de oxidación de 1.853 µA en el sensor modificado con nanopartículas metálicas se presenta una corriente de 2.080 µA, que es 1.122 veces mayor que la proporcionada con el SPE. Para el caso de las muestras de AU diluidas en saliva artificial el SPE presenta una corriente de oxidación de 1.9508 µA en comparación con los 2.0932 µA en el SPE-AuNPs.

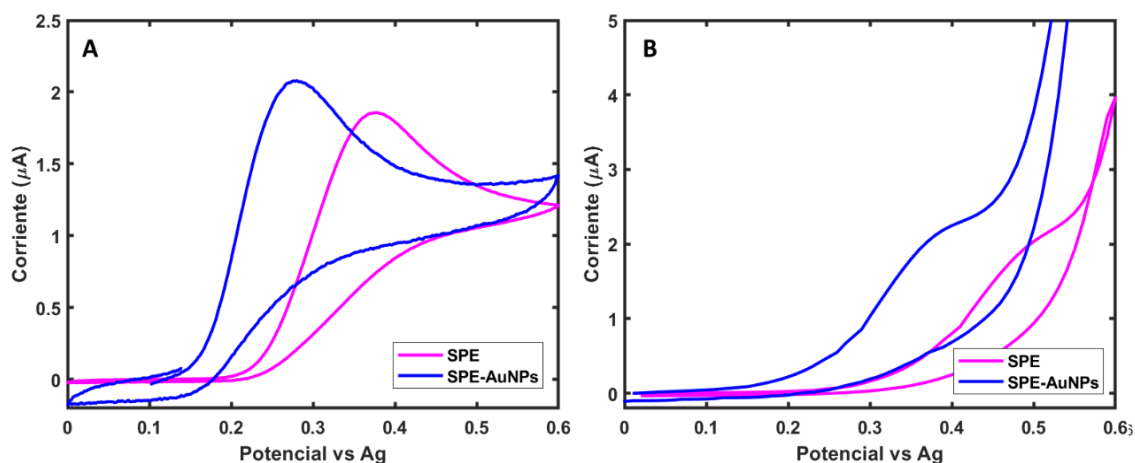


Fig. 52 Voltamperometría cíclica en 200 μM de ácido úrico del SPE y el SPE-AuNPs. A) Corresponde a soluciones en PBS y B) corresponde a soluciones en saliva artificial.

A pesar de que la VC demostró resultados alentadores para el sensado de AU, su principal utilidad fue la de establecer los potenciales de oxidación de cada electrodo desarrollado. Considerando estos resultados, se propuso el uso de la técnica de amperometría pues la demanda instrumental es menor y la detección puede simplificarse grandemente empleando potenciales fijos en la determinación del AU. Para la implementación de la técnica de amperometría se consideró a los potenciales de 0.3 V y 0.4 V, debido a que el primer potencial se encuentra entre los potenciales de oxidación de AU en la superficie del SPE-AuNPs tanto en saliva artificial como PBS, mientras que el segundo potencial se encuentra entre los potenciales de oxidación de AU en el SPE.

4.2 Detección de ácido úrico por amperometría con el sensor desarrollado.

Las amperometrías realizadas se llevaron a cabo utilizando tanto el potenciostato comercial 910 PSTAT mini de Metrohm como el sistema desarrollado en este trabajo.

En primer lugar, se muestran los resultados de la optimización del sistema de medición, que consiste en las pruebas amperométricas realizadas empleando dos potenciales diferentes y utilizando cinco de las siete ganancias disponibles en el potencióstato LMP91000. Todas estas pruebas también son ejecutadas con el 910 PSTAT mini, lo que permite realizar comparativas directas. Después se presentan los resultados de la detección amperométrica de ácido úrico diluido tanto en PBS como en saliva artificial.

4.3 Uso del sistema de detección.

El sistema electroquímico desarrollado cuenta con una resolución de 100 mV, considerando que se utilizó un voltaje de referencia fijo de 5 V y el sistema de divisores interno del LMP91000. Debido a que la resolución del ADC ADS1115 es de 16 bits y el rango de voltaje utilizado es ± 0.256 V, el intervalo de cuantización de voltaje está dado por la ecuación (4.1):

$$q = \frac{V_{ir}}{2^n} \quad (4.1)$$

Donde, q es el intervalo de cuantización, V_{ir} el margen de voltaje de entrada del ADC y n es el número de bits de las palabras binarias del ADC [99].

Así, de acuerdo a la ecuación (4.1) el límite de cuantización es de 7.812 μ V. Recordando lo descrito en el capítulo 3, la configuración del ADC se asocia con el potencial analógico de salida del LMP91000 el cual es la suma del potencial proporcional a la corriente del electrodo y el voltaje de *offset* programado en el mismo dispositivo. El límite de cuantización de corriente depende de la resistencia que se esté usando en el amplificador de transimpedancia del LMP91000. A continuación, se muestran los resultados de optimización del sistema desarrollado, con el fin de elegir la resistencia con la que el sistema presenta el mejor desempeño.

4.3.1 Optimización del sistema de medición.

Con el fin de asegurar que el desempeño del potenciostato desarrollado a partir del LMP91000 sea confiable, se realizaron amperometrías con 0.4V y 0.5V con ganancias de 2.75 K Ω , 3.5 K Ω , 7 K Ω , 14 K Ω y 35 K Ω . Mismas que se compararon con mediciones hechas con el potenciostato comercial 910 PSTAT mini de Metrohm. Para todos estos experimentos se utilizó el SPE.

4.3.1.1 Evaluación de amperometría a potencial de +0.4 V.

Estas pruebas se realizaron a un potencial fijo de 0.4 V vs Ag utilizando el SPE en una celda de 30 mL con un volumen inicial de 18 mL de PBS. Se realizaron diez adiciones, cada una de un volumen de 200 μ L de una solución de AU con concentración de 1 mM, lo que sería correspondiente a una concentración de 10 μ M de AU por adición. En la figura 53 se muestran las gráficas obtenidas para las pruebas realizadas con una concentración de 10 μ M por adición en cinco de las siete ganancias programables del amplificador de transimpedancia del LMP91000. También se puede apreciar el comportamiento del 910 PSTAT mini, en donde los primeros escalones debidos a la oxidación de AU están bien formados, pero después de la cuarta adición van disminuyendo la corriente entregada por el SPE. Este comportamiento se asocia a una saturación del sensor, más no del instrumento. Este mismo comportamiento se ve replicado en las cinco señales obtenidas con el LMP91000, pero se acentúa más en las ganancias de 3.5, 7 y 35 K Ω .

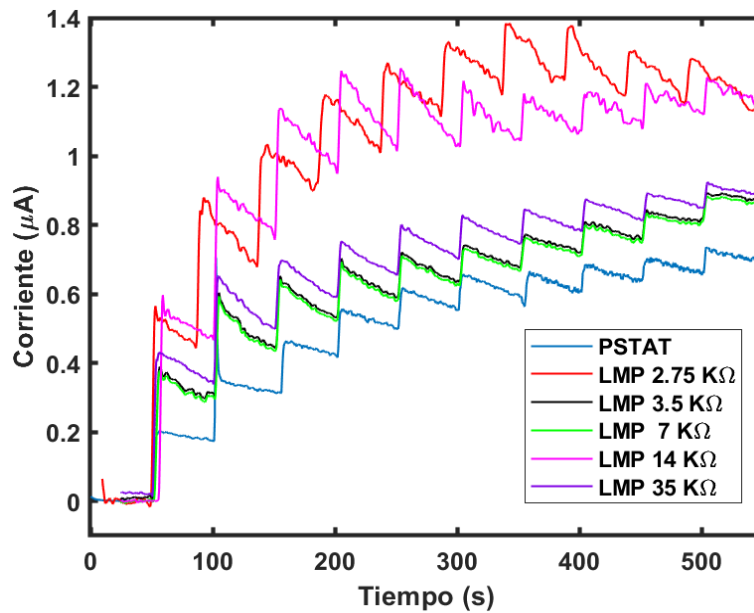


Fig. 53 Comparación cuantitativa de señales obtenidas en una amperometría empleando el SPE con un potencial de 0.4V vs Ag entre el 910 PSTAT mini(azul) y LMP91000 con diferentes ganancias.

En la figura 54 se presentan las comparativas una a una entre la señal medida mediante el 910 PSTAT mini y las señales obtenidas con el LMP91000. De esta manera se hace más evidente que el comportamiento del LMP91000 asemeja al del 910 PSTAT mini, sobre todo en las ganancias 3.5 KΩ (fig. 52B), 7 KΩ (fig. 52C) y 35 KΩ (fig. 52E). Ambos dispositivos muestran una pérdida de sensibilidad ante el aumento de concentración de AU utilizando el SPE a un potencial de 0.4 V vs Ag.

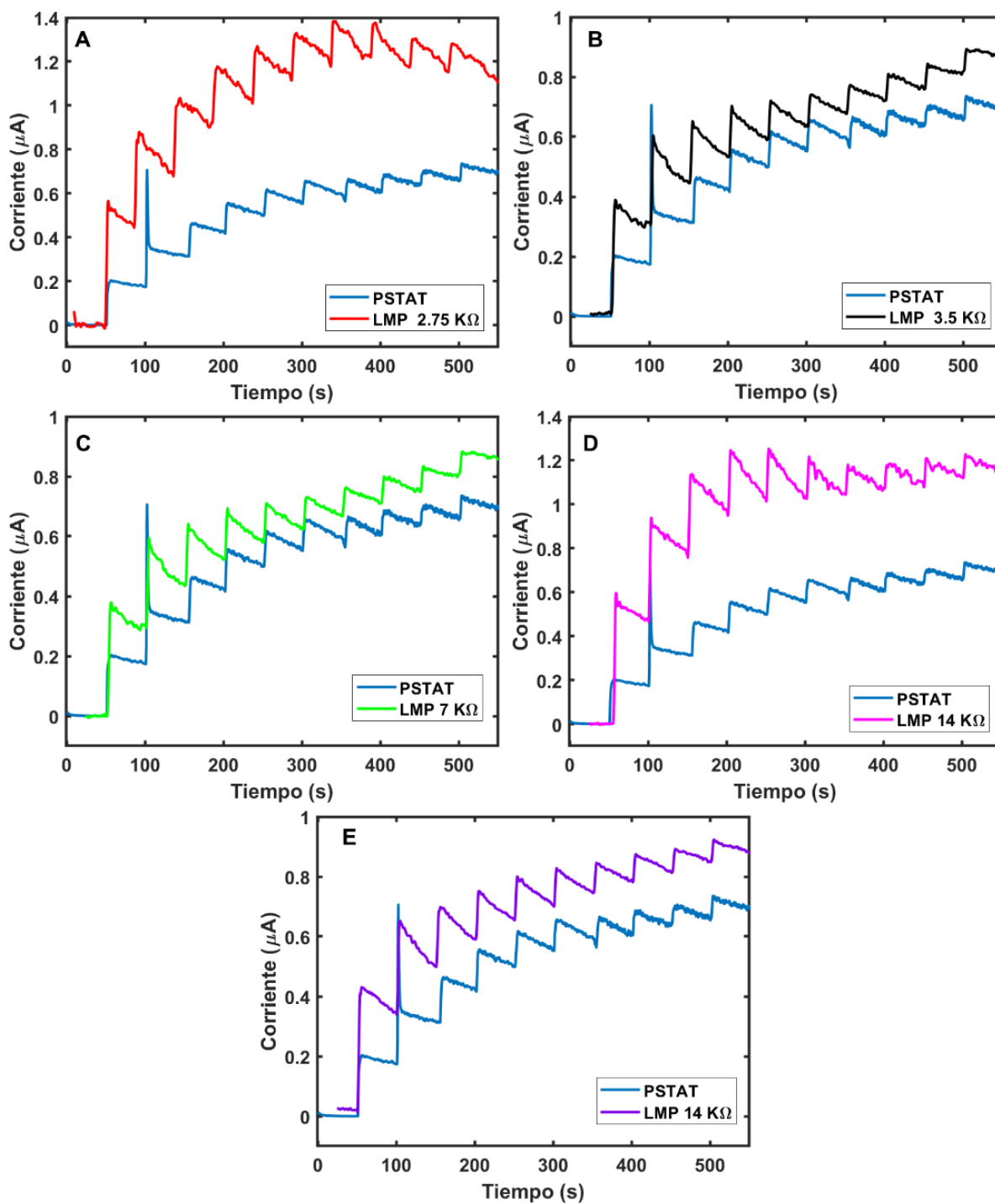


Fig. 54 Comparativa entre la señal medida con el 910 PSTAT mini (línea azul) y el LMP9100 a ganancias de A) 2.75 KΩ (línea roja), B) 3.5 KΩ (línea negra), C) 7 KΩ (línea verde), D) 14 KΩ (línea magenta) y E) 35 KΩ (línea morada). Todas a un potencial de 0.4 V vs Ag.

De las gráficas presentada se observa que en general el comportamiento exhibido por el SPE es no lineal en este potencial en ambos dispositivos.

4.3.1.2 Evaluación de amperometría a potencial de +0.5 V.

Estas pruebas se realizaron a un potencial fijo de 0.5 V vs Ag con el SPE, y al igual que con las pruebas anteriores la celda utilizada fue de 30 mL con un volumen inicial de 18 mL de PBS. Se hicieron adiciones de 200 μ L de una solución de AU con concentración de 1 mM, correspondiente a una concentración de 10 μ M de AU. En total se realizaron 10 adiciones.

En la figura 55 se muestran las señales obtenidas con el potencióstato desarrollado en este trabajo y el potencióstato comercial 910 PSTAT mini. Al igual que el caso anterior tanto el 910 PSTAT mini como el LMP91000 exhiben comportamientos muy similares. En un potencial de 0.5 V vs Ag el comportamiento del sensor es más lineal en comparación con 0.4 V vs Ag presumiblemente debido a la falta de un catalizador en la superficie, por lo que la reacción de oxidación de AU requeriría más energía.

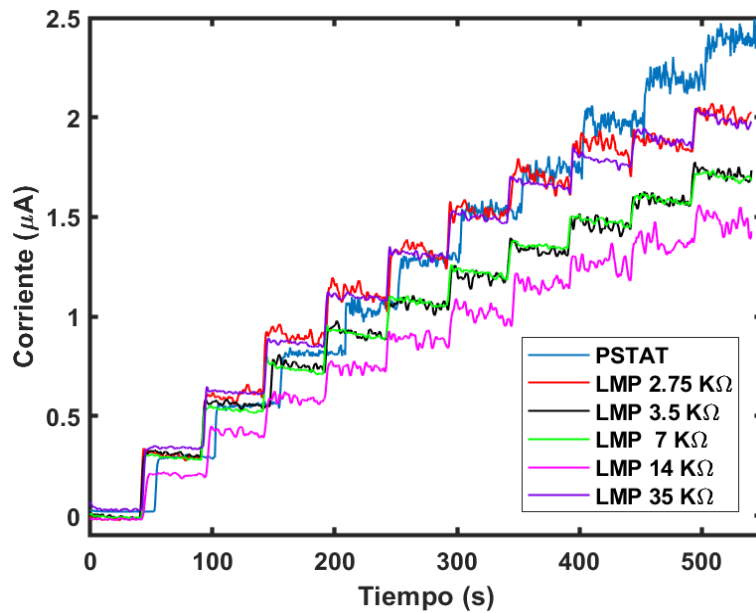


Fig. 55 Comparación cuantitativa de señales obtenidas en una amperometría empleando el SPE con un potencial de 0.5V vs Ag entre el PSTAT(azul) y LMP91000 con diferentes ganancias.

La figura 56 muestra una comparativa una a una de las señales medidas en el LMP91000 contra la que se obtuvo con el 910 PSTAT mini. Es claro que ambos dispositivos reflejan un comportamiento muy similar, a pesar de que en todos los casos la sensibilidad en el LMP91000 decae antes que en el 910 PSTAT mini.

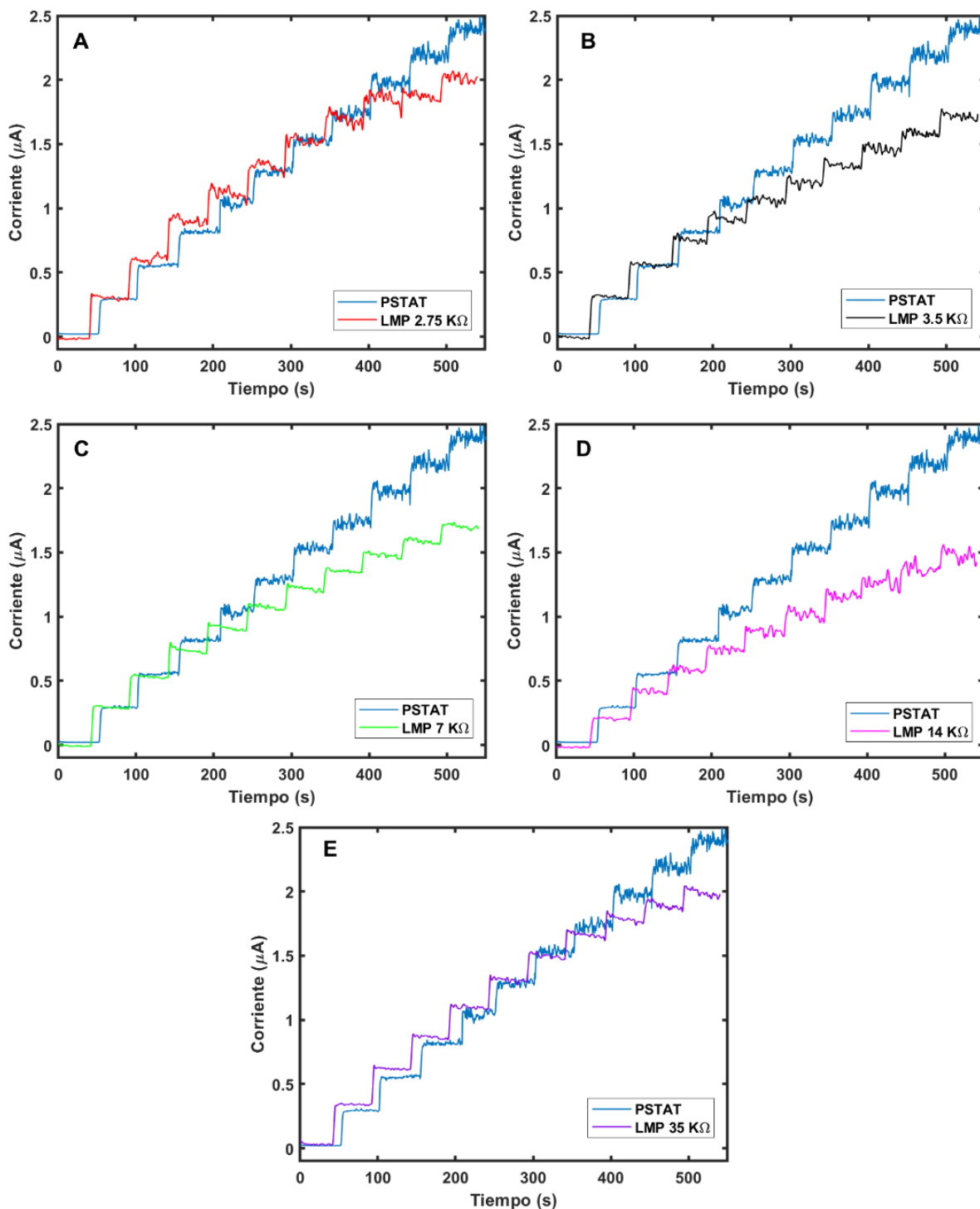


Fig. 56 Comparativa entre la señal medida con el 910 PSTAT mini (línea azul) y el LMP9100 a ganancias de A) 2.75 K Ω (línea roja), B) 3.5 K Ω (línea negra), C) 7 K Ω (línea verde), D) 14 K Ω (línea magenta) y E) 35 K Ω (línea morada). Todas a un potencial de 0.5 V vs Ag.

Analizando el comportamiento de los equipos tanto a 0.4 V vs Ag como en 0.5 V vs Ag, es posible evidenciar que las señales obtenidas tienen una tendencia similar independientemente de la ganancia seleccionada. Por ello, se estableció que la resistencia de 7 K Ω es apropiada pues su valor no es tan pequeño como para que no se evidencien los cambios en el potencial de salida del LMP91000, pero tampoco tan grande como para que además de amplificar la señal, amplifique también al ruido. Eligiendo esta resistencia, el intervalo de cuantificación de la corriente sería de 1.116 nA. Se puede concluir que en general el equipo tiene un comportamiento próximo al del equipo comercial en lo que respecta a la implementación de la técnica amperométrica. Los parámetros y respuestas relacionados con técnicas diferentes a esta no fueron sujeto de estudio, pues como se mencionó el objetivo de este trabajo, la intención no es construir un dispositivo idéntico al construido por Metrohm, sino un sistema amperométrico dedicado que evite el uso de equipos complejos y por ende más costosos.

4.4 Detección de ácido úrico en buffer de fosfatos y en saliva artificial.

4.4.1 Detección de ácido úrico en buffer de fosfatos.

Las señales obtenidas se presentan para cada una de las etapas de modificación de superficie del SPE (es decir SPE, aSPE y SPE-AuNPs), se hace una comparativa entre la señal obtenida con el 910 PSTAT mini y el sistema amperométrico desarrollado con el potenciostato LMP91000. Posteriormente se analizan en conjunto las tres versiones de electrodos desarrollados con el fin de visualizar el comportamiento de los tres electrodos que de manera separada no se podría lograr.

4.4.1.1 Amperometría con sensor serigrafiado de carbón.

En la figura 57A se presentan las señales obtenidas del proceso de amperometría después de 10 adiciones de 20 μ M a la celda con buffer de fosfatos en función del tiempo.

En este caso la señal que se obtuvo por medio del sistema amperométrico basado en el LMP91000 es 1.2 veces mayor a la desplegada por el 910 PSTAT mini. La corriente a 200 μM es de aproximadamente 3.3 μA para sistema desarrollado y 2.8 μA para el potenciostato comercial. En la figura 57B se muestran las curvas de calibración obtenidas a partir del aumento de corriente en cada adición en función de la concentración al momento de la adición. La sensibilidad del sistema construido con el LMP91000 es 1.21 veces mayor que la que se tiene en el 910 PSTAT mini.

Las señales en las figuras 57C y 57D corresponden a las obtenidas mediante una amperometría a un potencial de 0.4 V vs Ag. En la figura 57C se tienen las corrientes en función del tiempo, la señal proveniente del sistema que emplea el LMP91000 es un poco mayor a la del 910 PSTAT mini, en ambos se pueden observar los escalones de potencial asociados a los incrementos iniciales de concentración promovidos por cada adición de AU, posteriormente conforme se aumenta la concentración de AU, ambos equipos presentan una reducción en las corrientes promedio, presumiblemente debido a una saturación en el SPE ante el aumento de concentración de AU. En este potencial las corrientes promedio medidas fueron de $0.117 \pm 0.174 \mu\text{A}$ en el sistema construido con el LMP91000 y $0.070 \pm 0.058 \mu\text{A}$ en el 910 PSTAT mini, estos valores son menores que los que se obtienen en 0.3 V vs Ag de $0.430 \pm 0.172 \mu\text{A}$ empleando el sistema con LMP91000 y $0.390 \pm 0.036 \mu\text{A}$ para el 910 PSTAT mini. Lo que indica que el potencial para obtener una mejor respuesta en el SPE es evidentemente de 0.3 V vs Ag. En la figura 57D se muestran las corrientes en función de la concentración de AU.

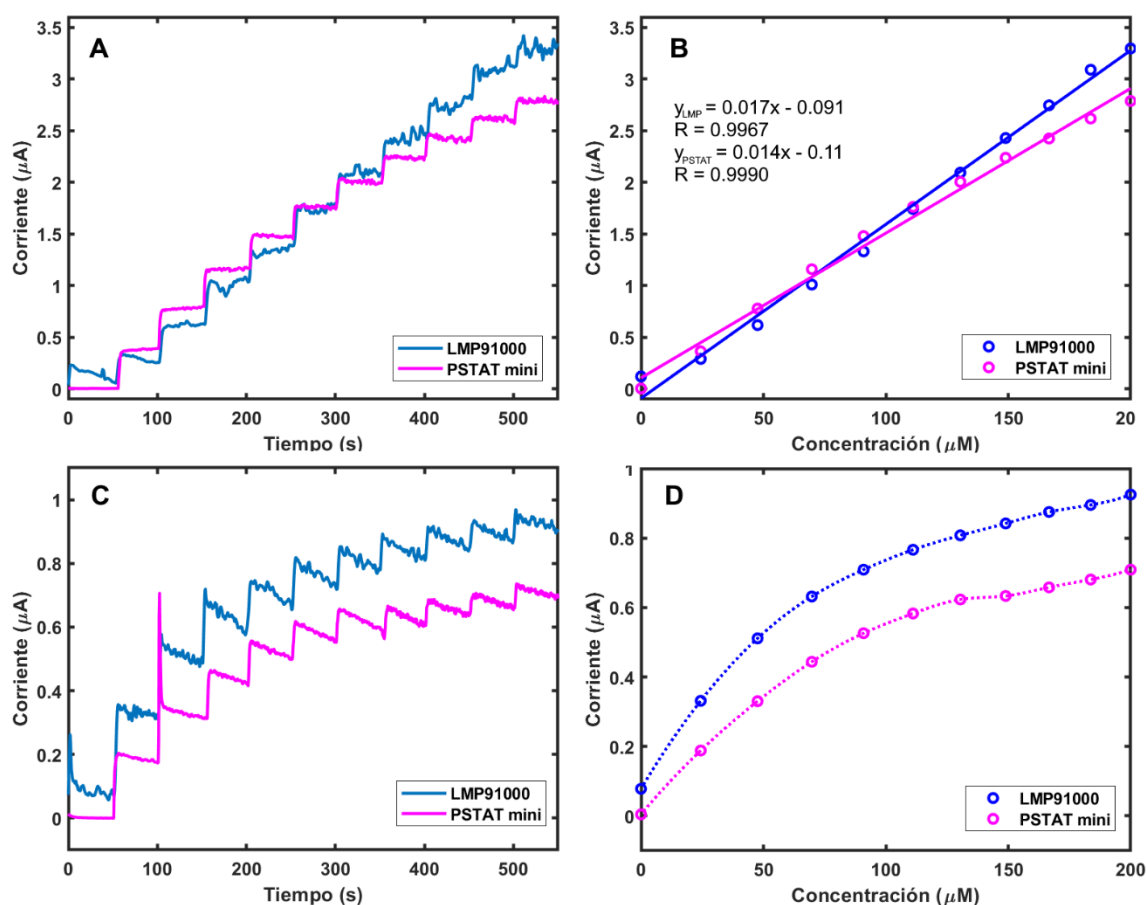


Fig. 57 Amperometría con SPE en PBS como matriz para la detección de ácido úrico. A un potencial de 0.3 V vs Ag (A) Corriente en función del tiempo. (B) Curvas de calibración. A un potencial de 0.4 V vs Ag (C) Corriente en función del tiempo. (D) Curvas de calibración.

4.4.1.2 Amperometría con sensor serigrafado de carbón pretratado.

En la figura 58A, se presentan las señales obtenidas como resultado de realizar una amperometría con el aSPE en PBS. En este experimental la corriente máxima fue $1.8 \mu\text{A}$ para una concentración de $200 \mu\text{M}$ de AU, esta corriente es menor que la obtenida con el SPE en el mismo potencial. Este comportamiento se puede deber al hecho de que, al realizar un pretratamiento a la superficie además de desprenderse de las impurezas de la tinta, quedan al descubierto los sitios activos del transductor o incluso hay una pérdida del material conductor durante el pretratamiento [73, 74, 93]. En la figura 58B se muestran

las curvas de calibración de ambos dispositivos, es notorio nuevamente que la sensibilidad medida en el sistema que emplea el LMP91000 es mayor que la que se obtiene con el 910 PSTAT mini. Respecto de las amperometrías a 0.4 V vs Ag estas se muestran en las figuras 58C y 58D. En la figura 58C se muestra la respuesta del sistema basado el LMP91000, cuya corriente máxima fue de 7.242 μA a una concentración de 200 μM de AU, magnitud que es cuatro veces mayor que la que se obtuvo en la misma concentración con un potencial de 0.3 V vs Ag. En la figura 58D se muestran las curvas de calibración que se obtienen a partir de las mediciones hechas con el aSPE tanto con el sistema basado en el LMP91000 como con el 910 PSTAT mini. La sensibilidad medida del primero es 1.2 veces mayor que la que se obtiene mediante el 910 PSTAT mini.

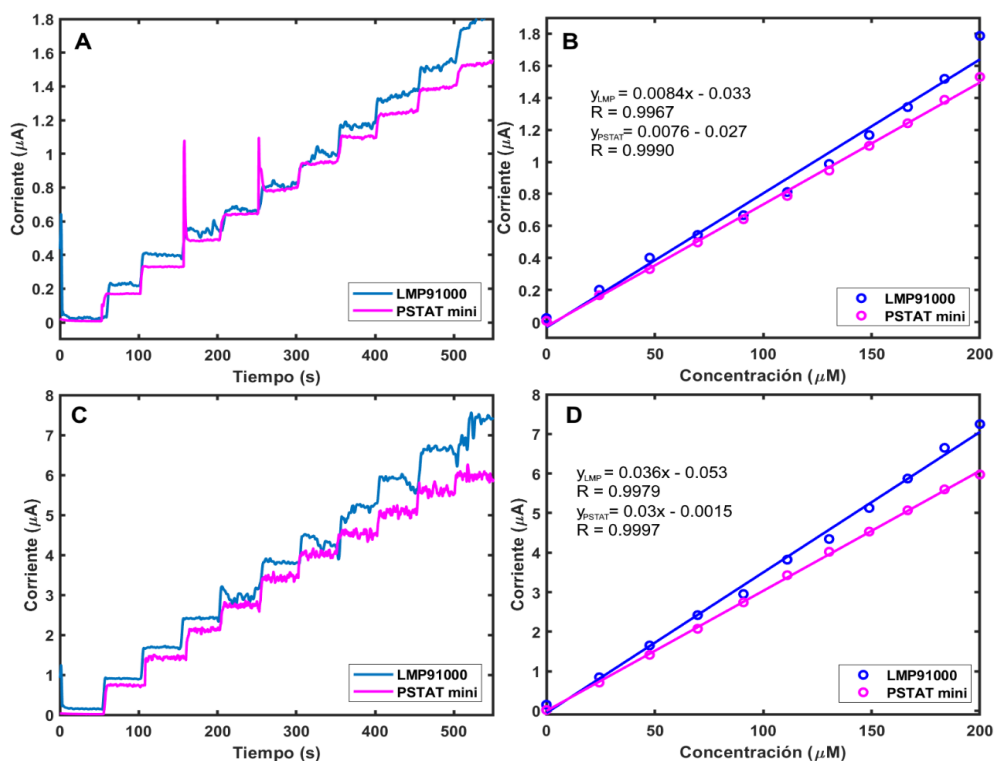


Fig. 58 Amperometría con aSPE en PBS como matriz para la detección de ácido úrico. A un potencial de 0.3 V vs Ag (A) Corriente en función del tiempo. (B) Curvas de calibración. A un potencial de 0.4 V vs Ag (C) Corriente en función del tiempo. (D) Curvas de calibración.

4.4.1.3 Amperometría con sensor serigrafiado de carbón con nanopartículas de oro.

Se presenta en la figura 59 las señales de ambos dispositivos en una amperometría con el SPE-AuNPs. En la figura 59A, que muestra las amperometrías a un potencial de 0.3 V vs Ag, la corriente medida en una concentración de 200 μM de AU es de 4.376 μA , esto es mayor en comparación con las corrientes tanto en el SPE (3.3 μA) y el aSPE (1.8 μA). Lo anterior corrobora los resultados obtenidos al caracterizar la superficie por SEM como al realizar voltamperometría cíclica: la respuesta electroquímica del sensor mejora con la electrodeposición de nanopartículas de oro. Las curvas de calibración correspondientes a las mediciones con el sistema basado en el LMP91000 y el 910 PSTAT mini con el SPE-AuNPs a 0.3 V vs Ag se muestran en la figura 59B. Las señales que se muestran en la figura 59C pertenecen a la amperometría en PBS a un potencial de 0.4 V vs Ag con el SPE-AuNPs. En una concentración de 200 μM de AU se tienen 9.038 μA de corriente, que es 2.065 veces mayor que lo que se tiene a 0.3 V vs Ag. La figura 59D muestra las corrientes en función del tiempo obtenidas mediante los datos de ambos dispositivos a un potencial de 0.4 V vs Ag.

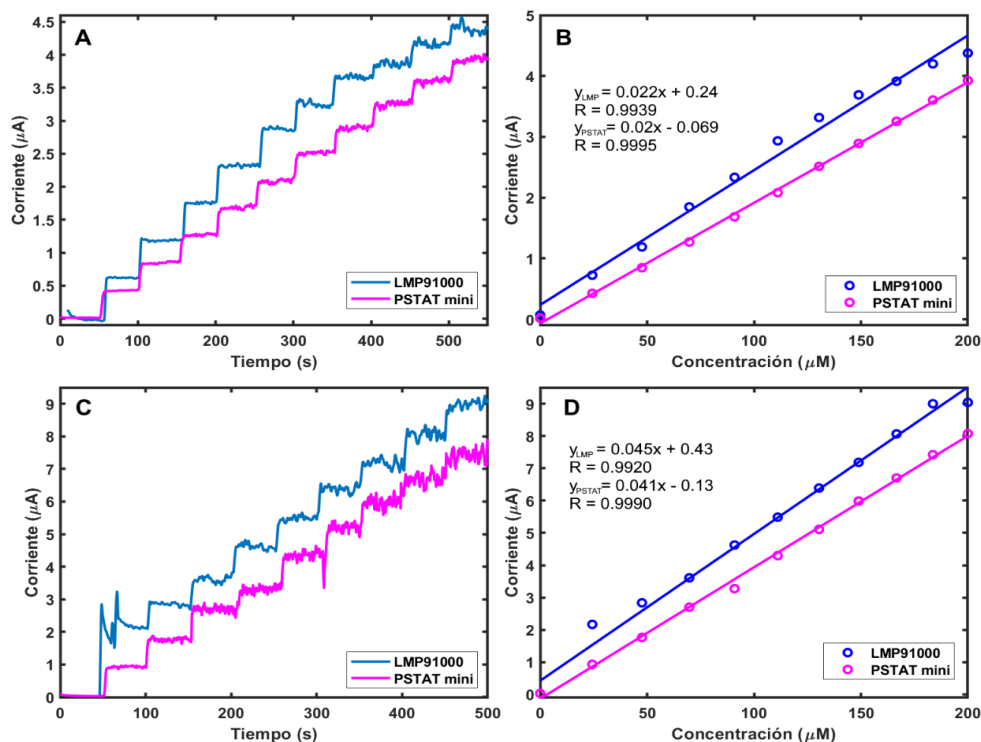


Fig. 59 Fig. 59 Amperometría con SPE-AuNPs en PBS como matriz para la detección de ácido úrico. A un potencial de 0.3 V vs Ag (A) Corriente en función del tiempo. (B) Curvas de calibración. A un potencial de 0.4 V vs Ag (C) Corriente en función del tiempo. (D) Curvas de calibración.

4.4.1.4 Comparativa entre sustratos.

En la figura 60 se presenta una comparativa entre los materiales a un potencial de 0.3 V vs Ag, si bien ya se habían comentado las diferencias entre las corrientes entre los tres sensores se presenta ahora una comparativa visual con el fin de hacer notar el cambio ante las modificaciones superficiales. Con esto también se hace evidente la congruencia entre el comportamiento del LMP91000 con respecto del 910 PSTAT mini. Tanto en las mediciones efectuadas mediante sistema basado en el LMP91000 en la figura 60A, como las efectuadas con el 910 PSTAT mini en la figura 60B, la respuesta del SPE-AuNPs es el que al tener una mayor pendiente presenta mayor sensibilidad ante las concentraciones de AU. Esto debido a que la transferencia electrónica mejora al añadir

nanopartículas de oro a la superficie del electrodo de trabajo [64]. También es notorio que, en este potencial, el aSPE es el que muestra una menor sensibilidad con respecto a la oxidación de AU en su superficie que los otros dos electrodos. Se muestran las curvas de calibración en las figuras 60C y 60D para el sistema que emplea el LMP91000 y para el 910 PSTAT mini respectivamente.

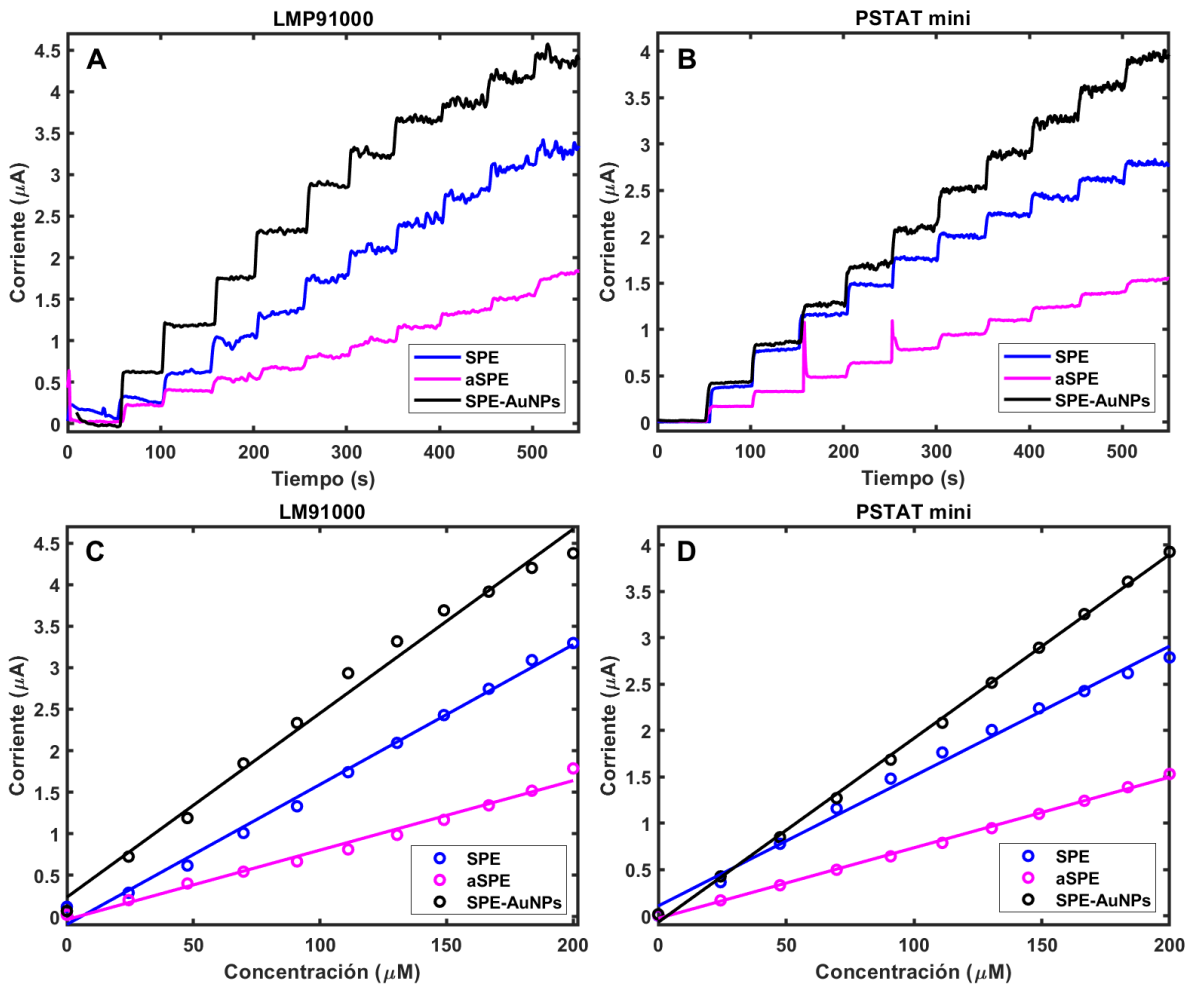


Fig. 60 Comparativa entre amperometrías con SPE, aSPE y SPE-AuNPs a un potencial de 0.3V en PBS. (A) Corresponde a las curvas obtenidas con los datos proporcionados por el sistema basado en el LMP91000, (B) corresponde a los datos obtenidos con el 910 PSTAT mini, (C) corresponde a las curvas de calibración obtenidas mediante las amperometrías realizadas en el LMP91000, finalmente (D) corresponde a las curvas de calibración obtenidas de las mediciones realizadas con el 910 PSTAT mini.

En lo correspondiente a la amperometría con 0.4 V vs Ag, se presentan en la figura 61 las corrientes en función del tiempo y las corrientes obtenidas en función de las concentraciones. En este potencial tanto el aSPE como el SPE-AuNPs mostraron tener gran sensibilidad a las concentraciones de AU, esto puede ser debido a que el potencial de oxidación del ácido úrico es muy cercano a 0.4 V y a que las superficies de ambos sensores son más conductoras que la del SPE [73, 97].

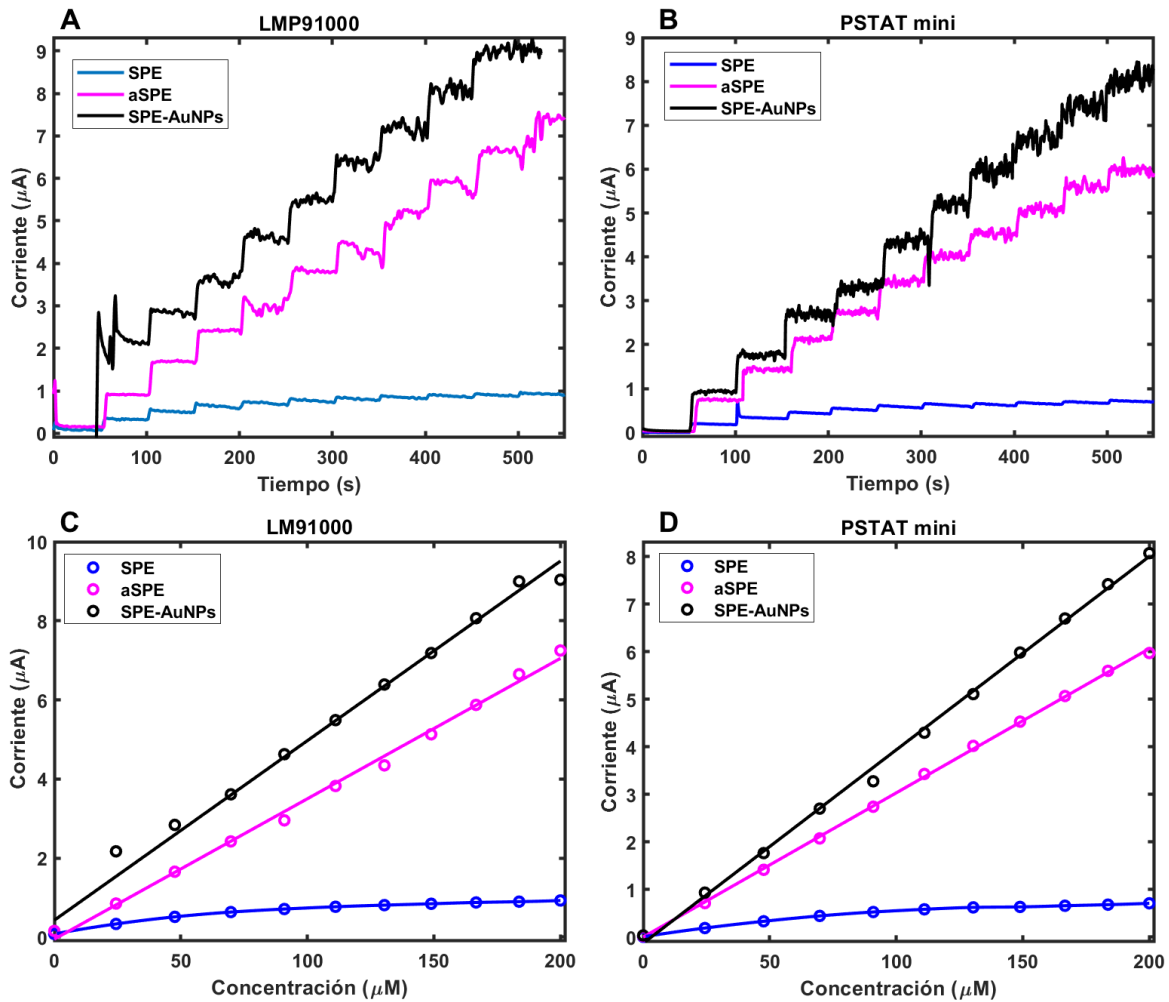


Fig. 61 Comparativa entre amperometrías con SPE, aSPE y SPE-AuNPs a un potencial de 0.4V en PBS. (A) Corresponde a las curvas obtenidas con los datos proporcionados por el sistema basado en el LMP91000, (B) corresponde a los datos obtenidos con el 910 PSTAT mini, (C) corresponde a las curvas de calibración obtenidas mediante las amperometrías realizadas en el LMP91000, finalmente (D) corresponde a las curvas de calibración obtenidas de las mediciones realizadas con el 910 PSTAT mini.

Las corrientes promedio en ambos potenciales utilizados se enlistan en la tabla 8. Es notable que en promedio el aumento de corriente ante cada adición de ácido úrico es mayor en el SPE-AuNPs en comparación con los otros dos sensores, tanto a 0.3V vs Ag como a 0.4V vs Ag.

Tabla 8 Corrientes promedio obtenidas en las amperometrías en buffer de fosfatos como matriz principal de detección.

Sensor	0.3 V vs Ag		0.4 V vs Ag	
	LMP91000	PSTAT mini	LMP91000	PSTAT mini
SPE	0.3176 ± 0.0752 μA	0.2783 ± 0.0871 μA	0.1179 ± 0.0774 μA	0.0704 ± 0.0585 μA
aSPE	0.1762 ± 0.0395 μA	0.1523 ± 0.0092 μA	0.7094 ± 0.1191 μA	0.5954 ± 0.1096 μA
SPE-AuNPs	0.4305 ± 0.1726 μA	0.3908 ± 0.0366 μA	0.9457 ± 0.6370 μA	0.8043 ± 0.1376 μA

De las mediciones con el SPE, el aSPE y el SPE-AuNPs utilizando la técnica de amperometría se calcularon algunos parámetros importantes como son: sensibilidad, linealidad, tiempo de respuesta y límite de detección (LDD) [26]. Estos parámetros se reportan en la tabla 9. De estos datos es evidente que el SPE-AuNPs además de poseer una mayor sensibilidad al AU en ambos potenciales presenta también un LDD menor en comparación con los otros dos electrodos. El SPE-AuNPs exhibe un buen porcentaje de linealidad y un tiempo de respuesta corto.

Tabla 9 Criterios de evaluación de los sensores químicos utilizados, utilizando tanto el potenciostato desarrollado y el comercial teniendo como matriz buffer de fosfatos salino.

Sensor		Sensibilidad ($\mu\text{A}/\mu\text{M}$)		Linealidad (%)		Tiempo de respuesta (s)		LDD (μM)	
		LMP	PSTAT	LMP	PSTAT	LMP	PSTAT	LMP	PSTAT
0.3 V	SPE	0.017	0.014	99.67	99.9	4.1 ± 1.926	3.35 ± 1.33	16.393	18.639
	aSPE	0.0084	0.0076	99.26	99.9	5.2 ± 1.653	5.9 ± 1.629	14.149	13.632
	SPE-AuNPs	0.022	0.02	99.39	99.95	3.5 ± 1.027	4.05 ± 1.755	11.912	12.472
0.4 V	SPE	0.049	0.048	99.94	99.9	2.8 ± 1.512	2.6 ± 1.867	17.441	17.559
	aSPE	0.036	0.03	99.79	99.97	4.85 ± 1.528	3.6 ± 1.100	14.782	14.537
	SPE-AuNPs	0.045	0.041	99.20	99.9	3.4 ± 1.1	2.750 ± 1.111	13.041	10.143

4.4.2 Detección de ácido úrico en saliva artificial.

4.4.2.1 Amperometría con sensor serigrafiado de carbón.

En las figuras 62A se presentan las corrientes en función del tiempo, tanto con el sistema basado en el LMP91000 como en el 910 PSTAT mini. La saliva artificial, a diferencia del PBS, es una matriz con mayor complejidad no solo debido a su composición sino también a sus propiedades físicas como su viscosidad y su densidad, por ello el comportamiento de los tres electrodos es diferente al que se obtiene al realizar los procedimientos en PBS. Esto es, los aumentos dados por cada adición no son en todos los casos un escalón completamente uniforme.

Se muestran las corrientes en función de las concentraciones de AU añadidas en la figura 62B. La corriente máxima en 200 μM de AU es de 4.432 μA , mientras que la sensibilidad

que se muestra en las curvas de calibración es de $0.023 \mu\text{A}/\mu\text{M}$ en el sistema basado en el LMP91000 y de $0.018 \mu\text{A}/\mu\text{M}$ en el 910 PSTAT mini. En ambos dispositivos los aumentos de corriente correspondientes a la oxidación de AU en saliva artificial no presentan la forma de un escalón uniforme.

Las amperometrías en un potencial de 0.4 V vs Ag se muestran en la figura 62C. En este potencial en general los sensores no tuvieron un comportamiento ideal, esto es muy probablemente debido a los componentes que constituyen la saliva artificial que no son descritos en la formulación proporcionada por el fabricante. Situación que puede impedir una correcta oxidación del AU a este potencial. En la figura 62D se muestran las curvas de calibración obtenidas de las amperometrías a un potencial de 0.4V en ambos dispositivos.

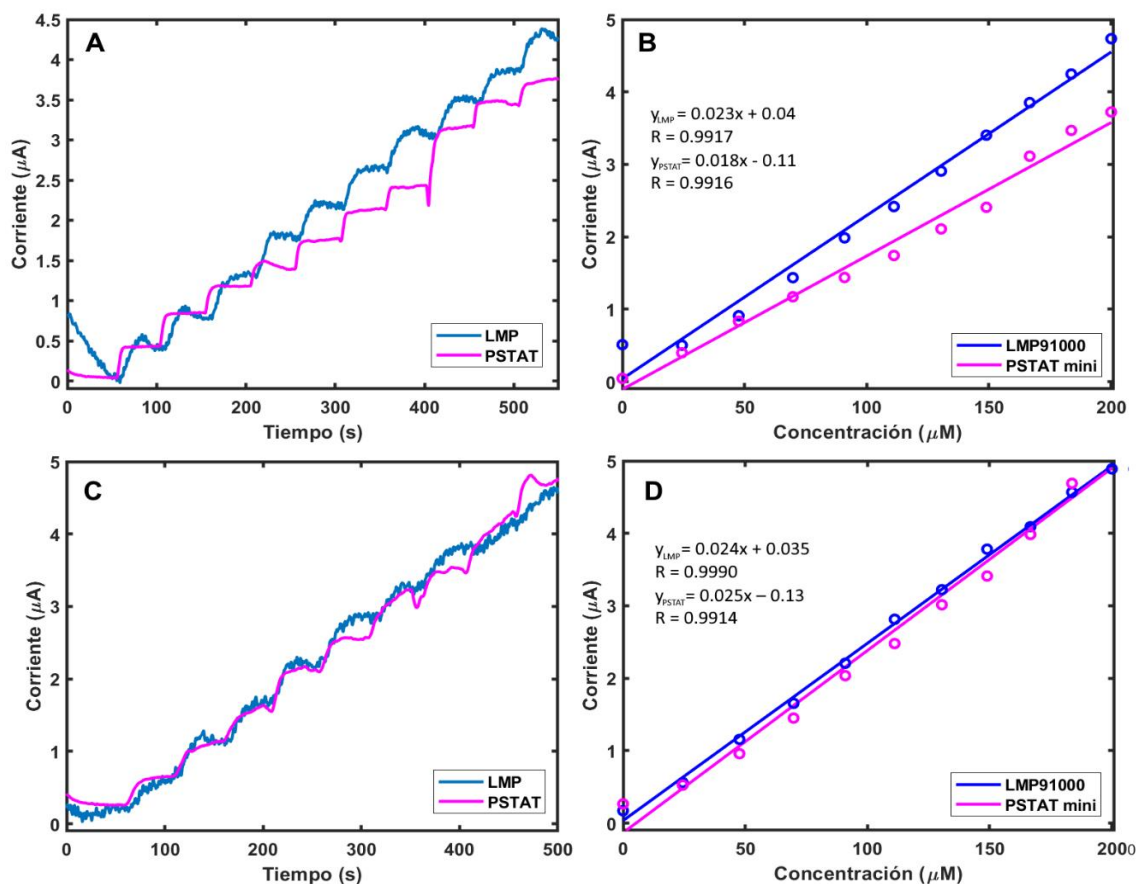


Fig. 62 Amperometría con SPE con saliva artificial como matriz para la detección de ácido úrico. A un potencial de 0.3 V vs Ag (A) Corriente en función del tiempo. (B) Curvas de calibración. A un potencial de 0.4 V vs Ag (C) Corriente en función del tiempo. (D) Curvas de calibración.

4.4.2.2 Amperometría con sensor serigrafado de carbón pretratado.

En las figuras 63A y 63B se muestran las señales obtenidas de una amperometría con el aSPE, en saliva artificial a un potencial de 0.3 V vs Ag. A simple vista es notorio el cambio con respecto al SPE puesto que los aumentos de corriente correspondientes a la adición de ácido úrico son más uniformes a los obtenidos en el mismo potencial. A pesar de esto la corriente máxima que se alcanza con el aSPE en una concentración de 200 μM de AU es de 2.350 μA que es 1.886 veces menor que la que se consigue con el SPE.

Respecto de la amperometría a un potencial de 0.4 V vs Ag, las gráficas en las figuras 63C y 63D muestran las señales obtenidas, la corriente máxima alcanzada por el aSPE en este potencial es de 6.619 μA que es mayor a la que se obtiene por el SPE en condiciones similares. En un potencial de 0.3 V el aSPE muestra tener desempeño menor que el SPE y sin embargo en un potencial mayor esto cambia. En la figura 63D se presentan las curvas de calibración del aSPE en ambos dispositivos utilizados para las mediciones, la sensibilidad presentada por las mediciones del sistema basado en el LMP91000 es mayor en comparación con las obtenidas por el 910 PSTAT mini.

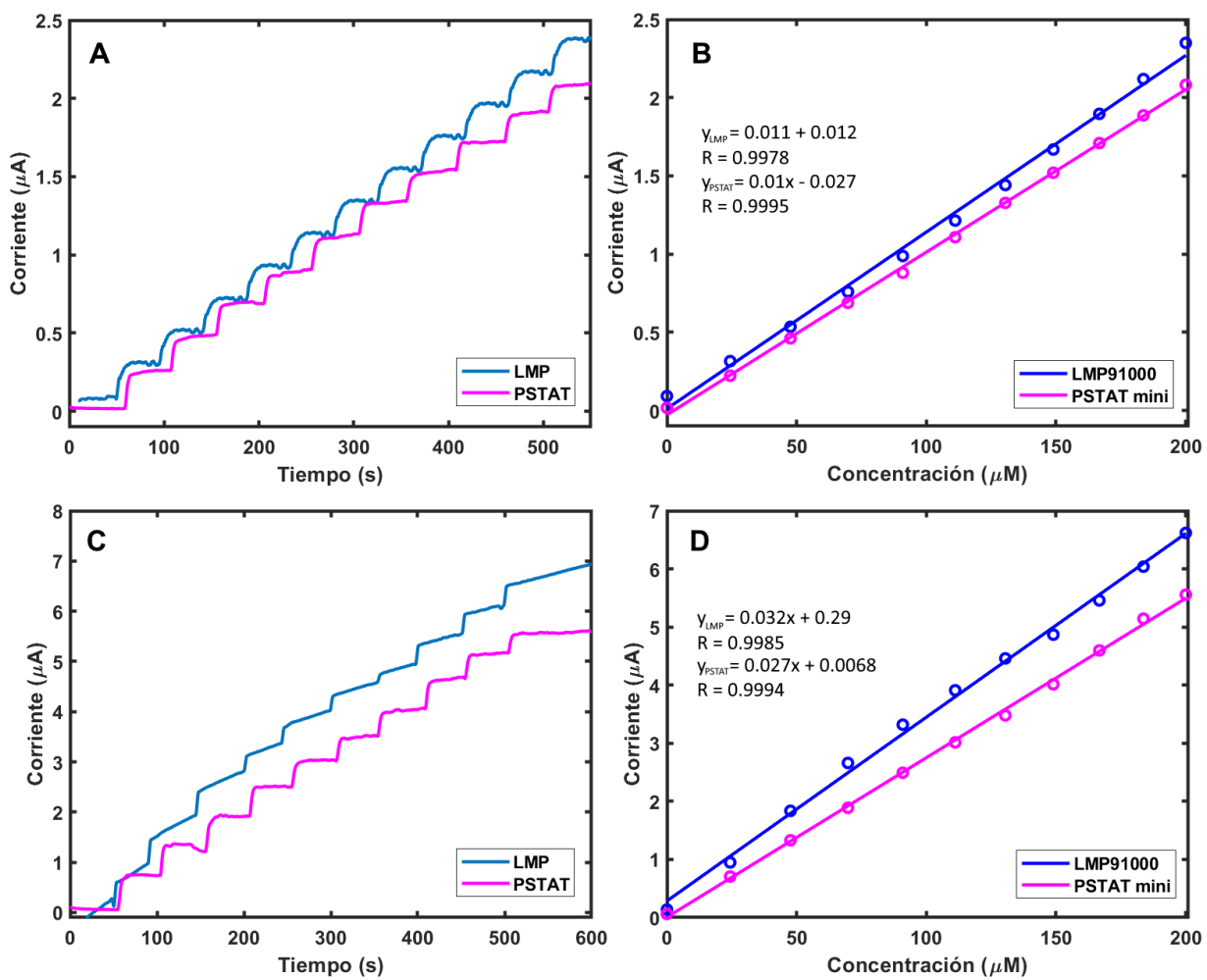


Fig. 63 Amperometría con aSPE con saliva artificial como matriz para la detección de ácido úrico. A un potencial de 0.3 V vs Ag (A) Corriente en función del tiempo. (B) Curvas de calibración. A un potencial de 0.4 V vs Ag (C) Corriente en función del tiempo. (D) Curvas de calibración.

4.4.2.3 Amperometría con sensor serigrafiado de carbón con nanopartículas de oro.

Las gráficas mostradas en las figuras 64A y 64B pertenecen a la amperometría con el SPE-AuNPs a 0.3 V vs Ag. La corriente máxima que se obtiene con este sensor es de 6.971 μA y esta es 1.572 veces mayor a la del SPE y 2.966 veces más grande que la corriente obtenida con el aSPE, es decir, en este potencial el SPE-AuNPs tuvo un mejor desempeño que los otros dos sensores. Esto continúa demostrando la propiedad catalítica del nanomaterial. En las figuras 64C y 64D se presentan tanto la corriente en función del tiempo como las corrientes en función de las concentraciones correspondientes a la amperometría en 0.4 V vs Ag del SPE-AuNPs. La corriente a una concentración de 200 μM de AU es de 7.881 μA , esto es 1.190 mayor que la corriente obtenida por aSPE y 1.611 veces mayor que la corriente alcanzada con el SPE.

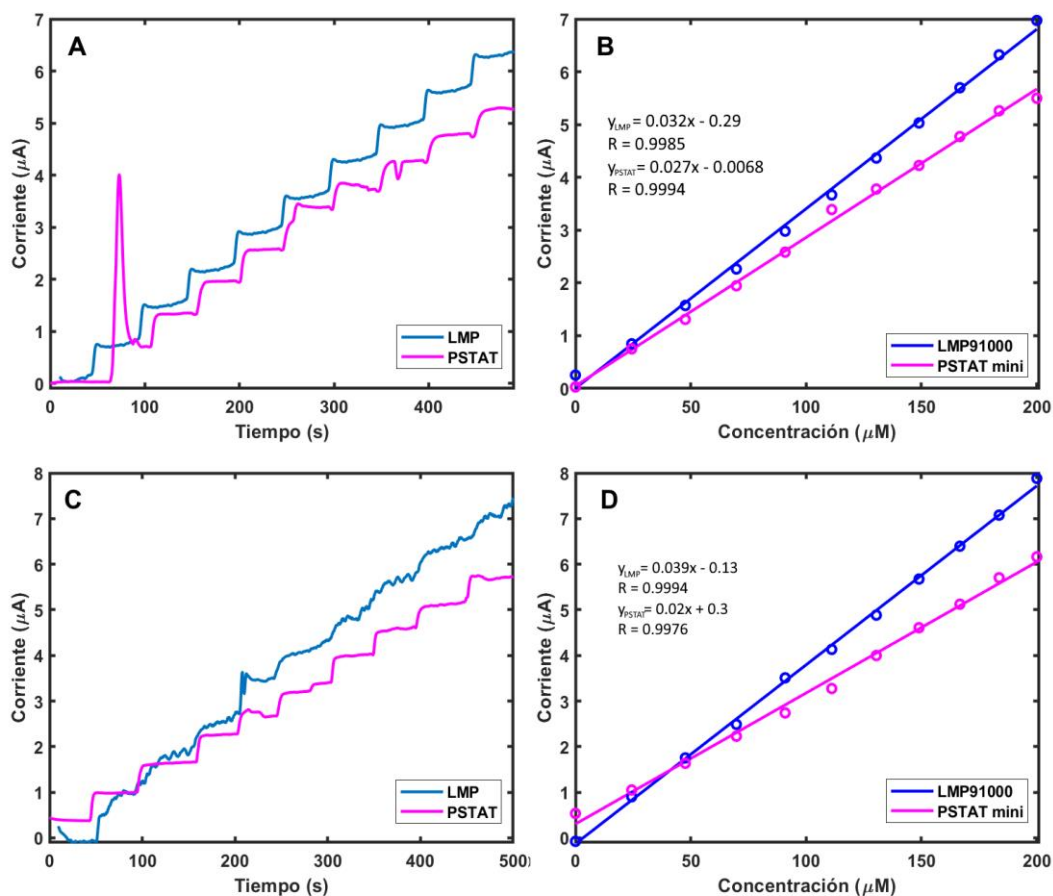


Fig. 64 Amperometría con SPE-AuNPs con saliva artificial como matriz para la detección de ácido úrico. A un potencial de 0.3 V vs Ag (A) Corriente en función del tiempo. (B) Curvas de calibración. A un potencial de 0.4 V vs Ag (C) Corriente en función del tiempo. (D) Curvas de calibración.

4.4.2.4 Comparación entre sustratos.

Al igual que con los experimentales hechos con PBS como matriz, con saliva artificial también se comparan los resultados obtenidos con los tres sensores con el fin de que la mejora en el sensor de carbón al ser modificado mediante la adición de nanopartículas de oro sea visiblemente notoria. En la figura 65A se presentan las señales medidas realizadas con el sistema basado en el LMP91000 mientras que en la figura 65B se muestran las que se obtuvieron con el 910 PSTAT mini. En ambos dispositivos se observa un comportamiento similar en la respuesta de las tres fases de desarrollo del electrodo

de trabajo, esto es, que el SPE-AuNPs muestra una mayor sensibilidad al AU en saliva artificial, seguido del SPE y por último el aSPE. En la figura 65C se presentan las curvas de calibración para cada sensor obtenidas de las medidas realizadas con el sistema basado en el LMP91000 y en la figura 65D se muestran las curvas calculadas con las mediciones adquiridas por el 910 PSTAT mini, a simple vista se puede notar que el SPE-AuNPs es el que tiene una mayor sensibilidad.

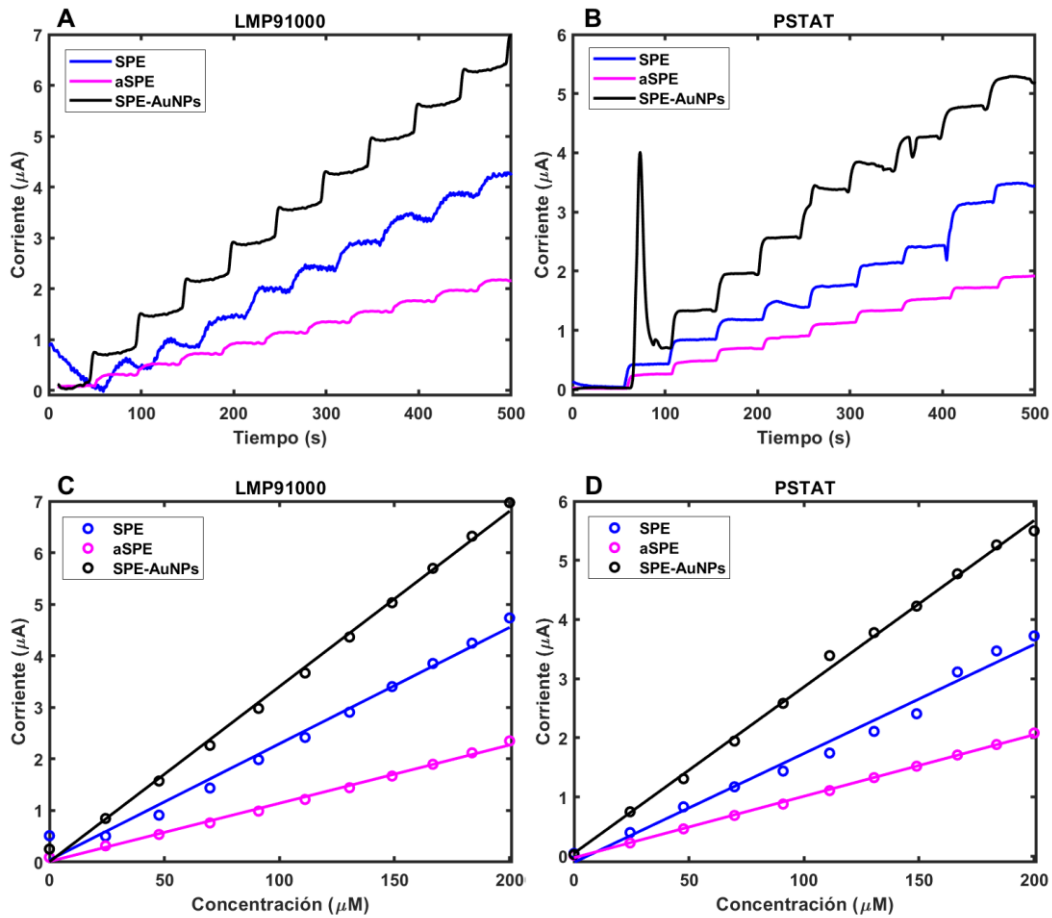


Fig. 65 Comparativa entre amperometrías con SPE, aSPE y SPE-AuNPs a un potencial de 0.3V con saliva artificial como matriz de detección. (A) Corresponde a las curvas obtenidas con los datos proporcionados por el sistema basado en el LMP91000, (B) corresponde a los datos obtenidos con el 910 PSTAT mini, (C) corresponde a las curvas de calibración obtenidas mediante las amperometrías realizadas en el LMP91000, finalmente (D) corresponde a las curvas de calibración obtenidas de las mediciones realizadas con el 910 PSTAT mini.

La figura 66A muestra las corrientes en función del tiempo que se obtienen al utilizar un potencial de 0.4V vs Ag en el sistema construido con el LMP91000 mientras que la figura 64B muestra las señales del 910 PSTAT mini con los tres electrodos. Al igual que en el potencial anterior ambos dispositivos muestran un comportamiento muy similar en cuanto a las señales obtenidas de cada electrodo. En este potencial el SPE-AuNPs presenta una mayor sensibilidad a la oxidación de AU en comparación con el SPE y el aSPE. A este potencial el aSPE presenta una mayor sensibilidad que el SPE, mientras que a 0.3 V vs Ag fue el SPE el que presentaba una mayor sensibilidad que el aSPE. Se muestran en la figura 66C las curvas de calibración calculadas con las mediciones del sistema basado en el LMP91000 en tanto que la figura 66D muestra las calculadas con las mediciones del 910 PSTAT mini. De esta manera es más evidente que el SPE-AuNPs posee mayor sensibilidad al ácido úrico en saliva artificial que los sensores SPE y aSPE.

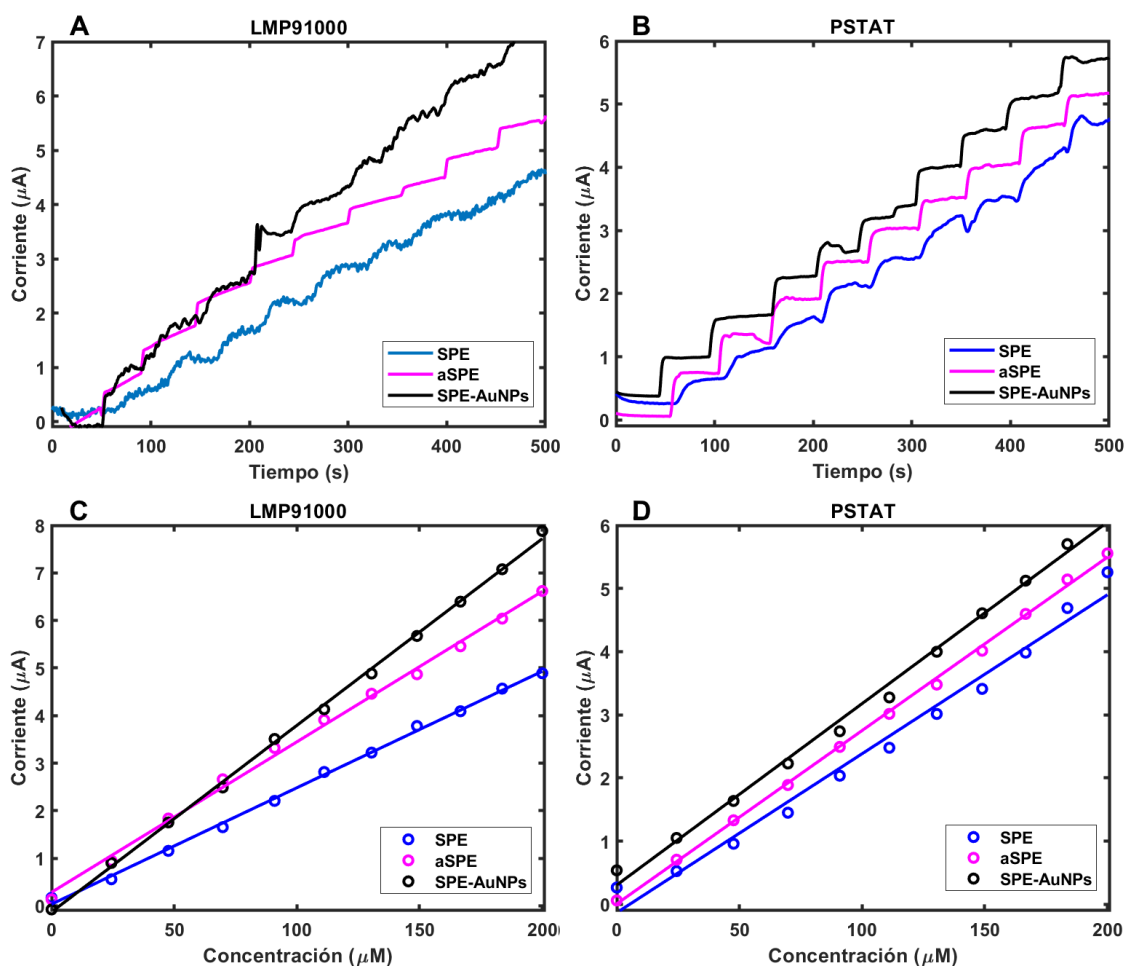


Fig. 66 Comparativa entre amperometrías con SPE, aSPE y SPE-AuNPs a un potencial de 0.4V con saliva artificial como matriz de detección. (A) Corresponde a las curvas obtenidas con los datos proporcionados por el sistema basado en el LMP91000, (B) corresponde a los datos obtenidos con el 910 PSTAT mini, (C) corresponde a las curvas de calibración obtenidas mediante las amperometrías realizadas en el LMP91000, finalmente (D) corresponde a las curvas de calibración obtenidas de las mediciones realizadas con el 910 PSTAT mini.

Las corrientes promedio debido a una adición de 20 μM de AU en saliva artificial en ambos potenciales utilizados para la técnica de amperometría se enlistan en la Tabla 10. De los datos presentados se tiene que en ambos potenciales la corriente promedio exhibida por el SPE-AuNPs es mayor en contraste con los otros dos electrodos utilizados.

Tabla 10 Corrientes promedio obtenidas en las amperometrías en saliva artificial como matriz principal de detección.

Sensor	0.3 V vs Ag		0.4 V vs Ag	
	LMP91000	PSTAT mini	LMP91000	PSTAT mini
SPE	0.4223 ± 0.1591 μA	0.3677 ± 0.1299 μA	0.4719 ± 0.1098 μA	0.4992 ± 0.1233 μA
aSPE	0.2257 ± 0.0034 μA	0.2064 ± 0.0204 μA	0.6482 ± 0.1483 μA	0.5495 ± 0.0713 μA
SPE-AuNPs	0.6718 ± 0.0413 μA	0.5470 ± 0.1662 μA	0.7957 ± 0.1253 μA	0.5625 ± 0.0735 μA

Al igual que con las mediciones hechas en PBS mediante la técnica de amperometría, se calcularon algunos parámetros como el tiempo de respuesta, porcentaje de linealidad, LDD y sensibilidad de los electrodos con las mediciones hechas en saliva artificial y se reportan en la tabla 11.

Tabla 11 Criterios de evaluación de los sensores químicos utilizados, utilizando tanto el potencióstato desarrollado y el comercial teniendo como matriz saliva artificial.

Sensor		Sensibilidad (μA/μM)		Linealidad (%)		Tiempo de respuesta (s)		LDD (μM)	
		LMP	PSTAT	LMP	PSTAT	LMP	PSTAT	LMP	PSTAT
0.3 V	SPE	0.023	0.018	99.17	99.16	14 ± 4.415	8.8 ± 2.137	18.752	19.650
	aSPE	0.011	0.01	99.78	99.95	6.4 ± 1.114	9.65 ± 1.001	16.272	17.020
	SPE-AuNPs	0.034	0.028	99.86	99.86	5.3 ± 3.342	4.55 ± 0.497	14.644	14.9071
0.4 V	SPE	0.024	0.025	99.9	99.14	11 ± 4.576	11.8 ± 4.655	22.752	20.796
	aSPE	0.032	0.027	99.85	99.94	6 ± 1.027	6.7 ± 1.159	18.477	19.922
	SPE-AuNPs	0.039	0.029	99.94	99.76	5 ± 2.778	6.85 ± 3.682	15.538	15.983

De los datos anteriores, en primera instancia los tiempos de respuesta de los tres electrodos son en promedio mayores que los que se tenían al medir en PBS. Mientras

que en PBS la respuesta de los electrodos ocurría en tiempos relativamente cortos y con poca diferencia entre ellos, en saliva artificial las respuestas de los electrodos a las adiciones son más lentas, muy posiblemente debido tanto a la composición de la saliva artificial como a la densidad que presenta [98]. Por tanto, el tiempo que le toma al SPE entregar una respuesta ante la adición de AU es mucho más lenta que la de los electrodos modificados superficialmente. En lo concerniente a la sensibilidad y el LDD es claro que el SPE-AuNPs es más sensible al AU aún en un medio de mayor complejidad como la saliva artificial, aunque la respuesta en PBS mostraba mayor sensibilidad. En este sentido el aSPE presenta un mejor desempeño que el SPE en saliva artificial.

Los resultados presentados muestran que el SPE-AuNPs puede realizar detecciones de AU de manera más sensible que el SPE adquirido en Metrohm en saliva artificial. El SPE-AuNPs mostró un buen desempeño en los dos potenciales empleados en los experimentales. De los potenciales empleados en el trabajo 0.4 V es el potencial al que normalmente se oxida el AU y el mismo al que algunas otras especies electroactivas presentes en fluidos biológicos como la saliva se oxidan igualmente [41, 62]. Así pues, también se realizaron pruebas con 0.3 V, que además de ser el potencial con el que se obtuvo un LDD menor en el SPE-AuNPs hay menor posibilidad de que otros componentes interfieran las detecciones de AU. Las señales en saliva artificial a este potencial de 0.3 V vs Ag, presentaron una menor distorsión en contraste con las obtenidas a 0.4 V vs Ag. Por tanto 0.3 V sería el potencial de preferencia para realizar detecciones de AU con el SPE-AuNPs

4.4.3 Amperometría con el uso de otros materiales.

Con el fin de probar la generalidad del sistema amperométrico diseñado sin la intención de comparar la respuesta del sensor desarrollado, se utilizó un cuarto sensor a base de carbón modificándolo superficialmente con una disolución de carbón vulcan. Este material conocido también como CX72R o *carbon vulcan black* fue donado para la

construcción de estos sensores por el laboratorio de Electromecánica y corrosión de ESIQIE-IPN a cargo del Dr. Arturo Manzo. Para fabricar el SPE modificado con carbón vulcan se depositó una gota sobre el electrodo de trabajo con un volumen de 10 μL de una solución hecha a partir de 10 mg de CX72R (1333-86-4), 750 μL de agua desionizada, 250 μL de isopropanol y 70 μL de nafion (31175-20-9). Este electrodo se identificará con el acrónimo SPE-CX72R y fue expuesto al mismo procedimiento utilizado con los otros electrodos estudiados anteriormente, realizando amperometrías con PBS como matriz de detección.

En las figuras 67A y 67B se presenta una comparativa entre el SPE, el aSPE, el SPE-AuNPs y el SPE-CX72R a un potencial de 0.3 V, se puede observar que tanto en 910 PSTAT mini como en el sistema basado en el LMP91000 el comportamiento de los electrodos es similar. Es decir, que en ambos equipos el SPE-CX72R es el electrodo con el que se obtiene la mayor corriente debida a la oxidación de AU en superficie. Esto puede ser debido a que el carbón vulcan posee buenas propiedades de conductividad y electroquímicas asociadas a la transferencia electrónica [100, 101]. Este material entonces tiene mayor transferencia electrónica que el carbón empleado en la fabricación del SPE, y por ello la señal de corriente entregada por el SPE-CX72R es mayor que en el resto de tres electrodos estudiados. Continuando en las figuras 67C y 67D, se presentan las curvas de calibración obtenidas de la técnica de amperometría aplicada a los diferentes electrodos. Mientras que en un rango de 0 – 200 μM de AU tanto el SPE, como el aSPE, y el SPE-AuNPs tiene un comportamiento muy cercano al lineal, eso no sucede con el SPE-CX72R.

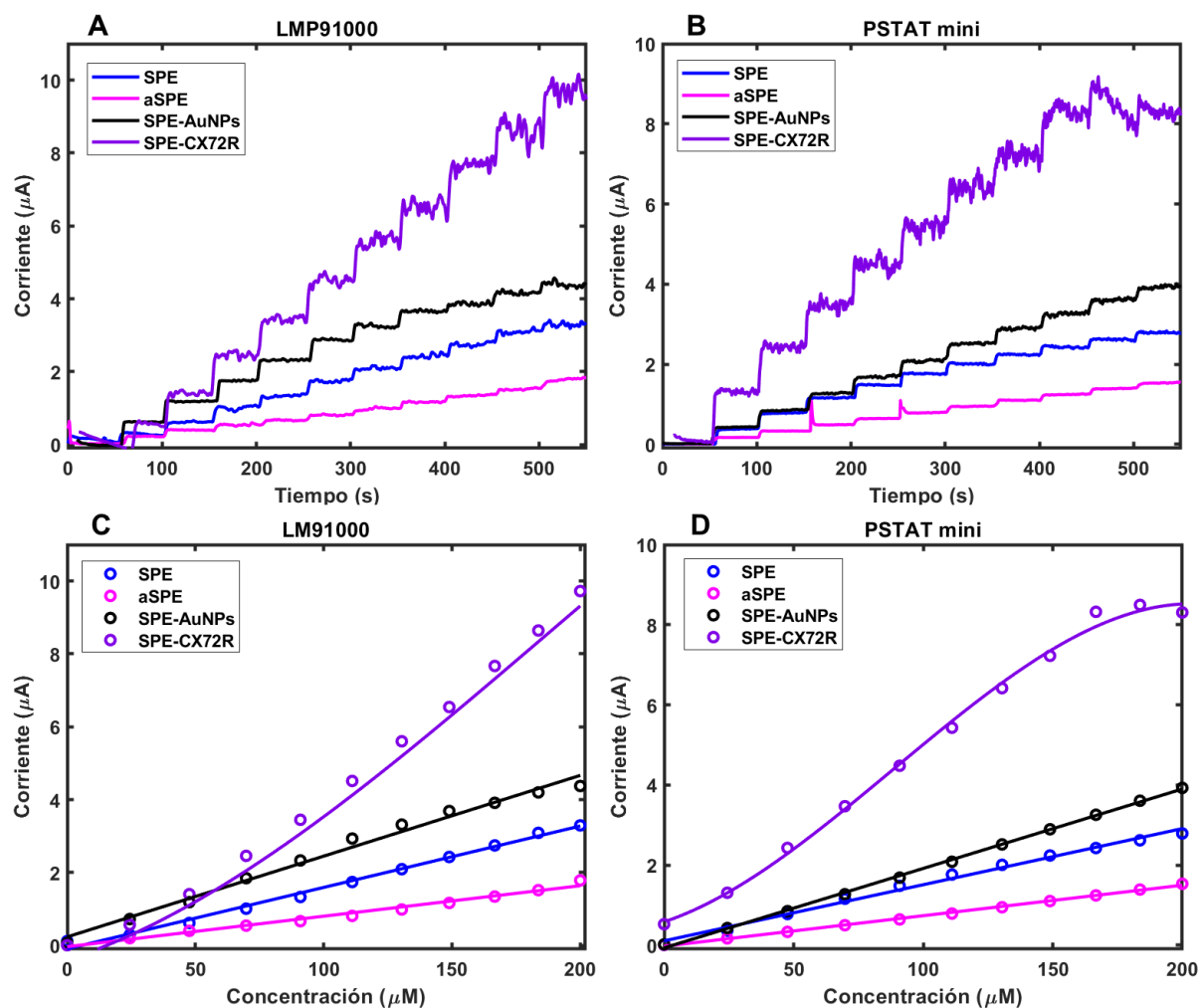


Fig. 67 Comparativa entre amperometrías con SPE, aSPE, SPE-AuNPs y SPE-CX72R a un potencial de 0.3 V vs Ag en PBS. (A) Amperometría utilizando el LMP91000 y (B) utilizando el 910 PSTAT mini. (C) Corresponde a las curvas de calibración obtenidas con los datos proporcionados por el sistema basado en el LMP91000, (D) corresponde a los datos obtenidos del 910 PSTAT mini.

Las figuras 68A y 68B presentan las señales provenientes de la amperometría efectuada en ambos dispositivos en un potencial de 0.4 V, nuevamente el SPE-CX72R entrega una mayor corriente debida a la oxidación de AU utilizando ambos dispositivos, en virtud de sus propiedades electrocatalíticas. Las figuras 68C y 68D muestran las curvas de calibración, a este potencial relacionadas con el comportamiento del SPE-CX72R que visualmente parece más cercano al comportamiento lineal.

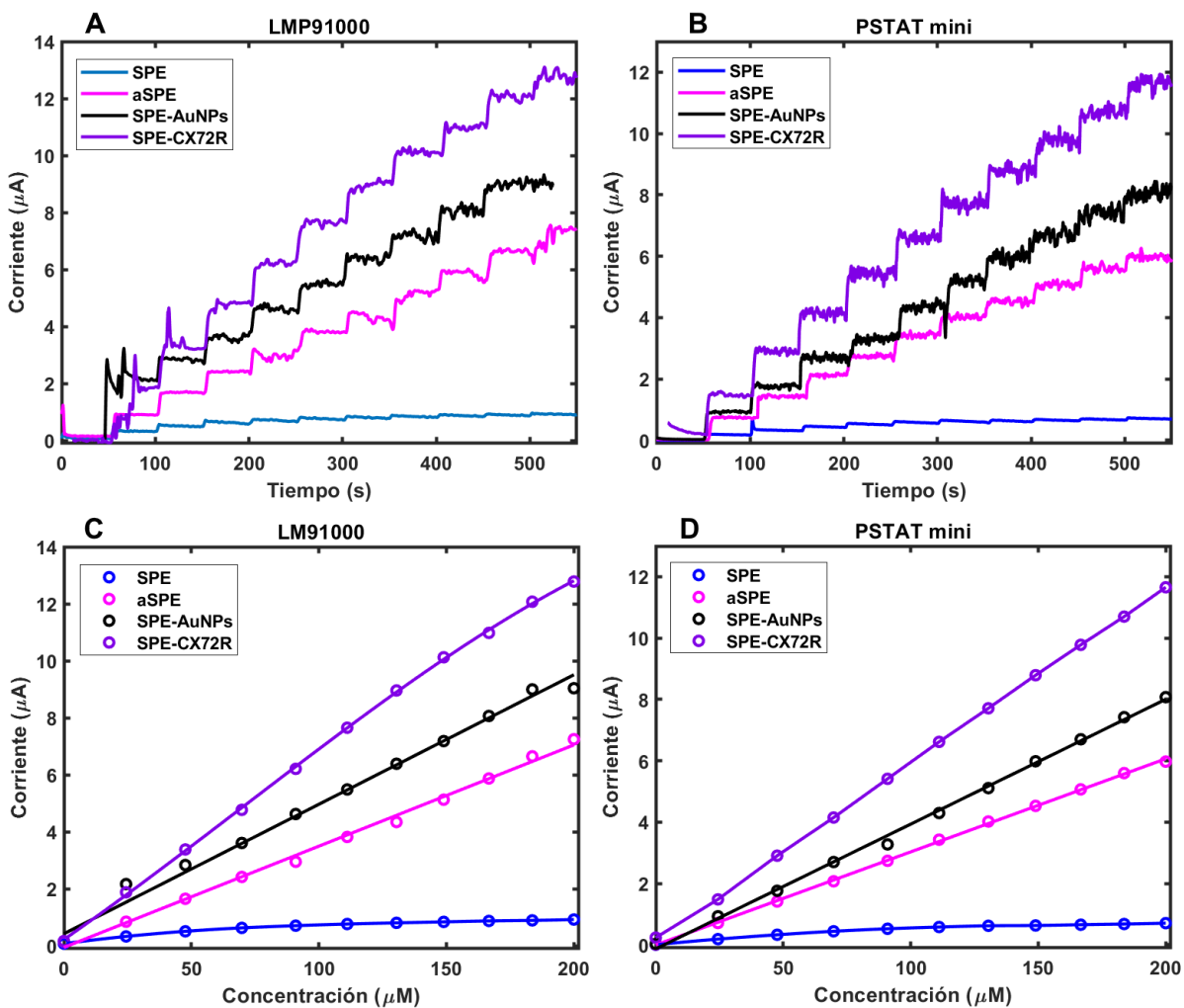


Fig. 68 Comparativa entre amperometrías con SPE, aSPE, SPE-AuNPs y SPE-CX72R a un potencial de 0.4 V vs Ag en PBS. (A) Amperometría utilizando el LMP91000 y (B) utilizando el 910 PSTAT mini. (C) Corresponde a las curvas de calibración obtenidas con los datos proporcionados por el sistema basado en el LMP91000, (D) corresponde a los datos obtenidos del 910 PSTAT mini.

Los resultados obtenidos muestran que el sistema amperométrico desarrollado en este trabajo fue capaz de mantener un comportamiento cercano al del potenciostato comercial al ser utilizado con un electrodo diferente con respecto al que se manejó para la optimización del sistema. Esto indica que es posible que este dispositivo pueda utilizarse con electrodos cuya superficie no sea un derivado del carbón como todos los que fueron

empleados durante las pruebas en este trabajo o para la detección de analitos diferentes al AU.

4.5 Sistema integral de detección desarrollado.

El sistema desarrollado en este trabajo (véase figura 69). Posee una resolución de tensión de 100 mV debido al potencial fijo de 5 V empleado como referencia, y una resolución de corriente de 1.116 nA relacionada tanto con el ADS1115 como con la ganancia elegida para el módulo TIA del LMP91000. El potencial máximo que se puede medir con el sistema amperométrico es de 4 V, este parámetro está dado por el voltaje máximo entre los canales analógicos del ADS1115, mientras que el potencial máximo que se puede inyectar a la celda es del $\pm 24\%$ del voltaje de referencia que en este caso es de ± 1.2 V. La corriente máxima que se puede medir está limitada por el LMP91000 y es 5 mA. El consumo de corriente del equipo completo es aproximadamente de 170 mA, siendo 168 mA para el ESP32, 12 μ A para el LMP91000 y 160 μ A para el ADS1115, estas corrientes fueron medidas durante las fases de operación de los experimentales usando multímetro Meterman 38XR. Estas características se reportan en la tabla 12.

Tabla 12 Características eléctricas del sistema amperométrico basado en LMP91000.

Parámetro	Valor
Resolución de voltaje	100 mV
Resolución de corriente	1.116 nA
Ganancia módulo TIA	7 K Ω
Referencia de voltaje	5 V
Cero interno	1 V
Potencial máximo	4 V
Potencial máximo en celda	± 1.2 V
Corriente máxima	5 mA
Consumo de corriente	170 mA

El voltaje de referencia aplicado al CI puede ir de 1.5 V hasta los 5 V, esto implica que se puede tener una resolución mínima de 30 mV hasta una máxima de 100 mV con una referencia de voltaje fijo. Ya que las pruebas en amperometría con los sensores desarrollados en este proyecto debían ser a los potenciales de 0.3 V y 0.4 V, se decidió utilizar una referencia de 5V con lo que la resolución de voltaje sería de 100 mV, con lo que se podría realizar la inyección de los potenciales deseados a la celda de manera sencilla. En la tabla 13 se presenta una comparativa entre este trabajo y otros que utilizaron el CI de TI para desarrollar un potenciostato dedicado a la técnica de amperometría o VC. De acuerdo a los datos proporcionados, el potenciostato desarrollado obtuvo un límite de cuantización menor que los reportados por otros trabajos. Por lo que es capaz de medir cambios de corriente muy pequeños.

Tabla 13 Comparativa entre potenciostatos desarrollados por otros autores a partir del uso del circuito integrado LMP91000 con el potenciostato fabricado en este trabajo.

Microcontrolador	Analito	Resolución de tensión	Técnicas voltamperométricas	Límite de cuantización	Ref.
Rfduino	Glucosa	50 mV	Amperometría	NR	[78]
PIC16LF1783	Glucosa	50 mV	Amperometría	NR	[79]
SAMD21	Cocaína	1 mV	VC, Amperometría, SWV, NPV	4.5 nA	[80]
ESP32	Ácido úrico	100 mV	Amperometría	1.2 nA	Este trabajo

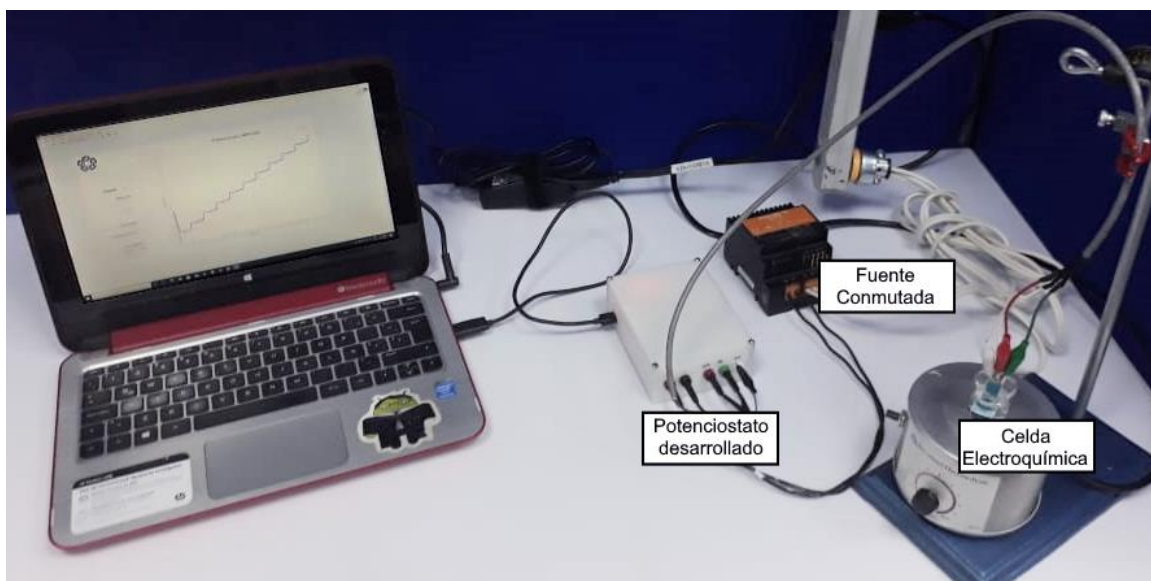


Fig. 69 Sistema integral diseñado para detección amperométrica AU

El sistema amperométrico diseñado e implementado en este trabajo tuvo un costo total aproximado de \$1522 pesos mexicanos y posee las dimensiones de 85 x 116 x 41 mm. En su conjunto, fue capaz de obtener una sensibilidad de $0.034 \mu\text{A}/\mu\text{M}$ con un límite de detección de $14.644 \mu\text{M}$ de AU empleando el SPE-AuNPs.

Capítulo 5.

5.1 Conclusiones y perspectivas.

El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un sistema capaz de detectar la presencia de ácido úrico en saliva artificial. Para lograrlo se abordaron dos aspectos importantes como la fabricación de un sensor químico modificado superficialmente sensible a ácido úrico y el desarrollo de instrumentación dedicada para implementar la técnica de amperometría. Con base a los objetivos planteados en este trabajo, se pueden obtener las siguientes conclusiones.

Respecto del desarrollo de un electrodo modificado superficialmente se observó que, mediante diferentes procesos, en este caso un pretratamiento electroquímico y la electrodeposición de un nanomaterial metálico, se puede modificar la superficie. De modo que la sensibilidad, el límite de detección e incluso el tiempo de respuesta del electrodo pueden verse beneficiados. Así mismo al ser el material de electrodo mucho más conductor, la oxidación de una especie electroactiva puede suceder en un potencial menor evitando potencialmente que especies interferentes puedan afectar el resultado. En este sentido se hizo evidente la ventaja brindada por la adición de otro material conductor al utilizar el SPE-AuNPs en la detección de AU en saliva artificial pues no solo obtuvo una mayor sensibilidad respecto del SPE y el aSPE si no que se obtuvo un límite de detección menor y un tiempo de respuesta dos veces más rápido que el del SPE en el mismo medio de detección. Por lo que a partir de los resultados de detección electroquímica es claro que la modificación superficial mediante nanopartículas de oro hecha al SPE mejoró la actividad electrocatalítica de éste, es decir, hubo un aumento en la velocidad a la que la reacción química ocurre en la superficie del electrodo. Esto fue demostrado mediante VC en soluciones de AU diluido en PBS y amperometría al realizar adiciones de AU, en todos los casos el sensor modificado mostró un mejor desempeño que aquel cuya superficie era solo de carbón. En lo correspondiente al uso de saliva

artificial como matriz de detección de AU, se demostró que el sensor desarrollado fue capaz de detectar AU en una matriz compleja sin necesidad de mayores tratamientos a la muestra. En consecuencia, se muestra un gran avance para realizar pruebas en muestras de saliva humana

Se observó que el método utilizado es sencillo, rápido y utiliza pocos reactivos y equipo común de laboratorio. Esto favorece el proceso de detección de AU, al tiempo que también es posible emplear una técnica amperométrica sencilla que puede ser implementada en un dispositivo dedicado de bajo costo sin tener la necesidad de recurrir a equipos comerciales más especializados como el potenciostato de Metrohm 910 PSTAT mini.

En lo referente a la instrumentación desarrollada en este trabajo, se demostró su utilidad en la determinación de ácido úrico por medio de amperometría, además también se cumplió con la disminución de dimensiones del sistema. Esto es importante en el desarrollo de tecnología que pueda cubrir las crecientes necesidades de diagnóstico ambulatorio.

Se verificó el desempeño de la instrumentación desarrollada versus el equipo comercial 910 PSTAT mini de Metrohm, utilizando el sensor desarrollado en la detección de ácido úrico. Al respecto, ambos mostraron un comportamiento muy parecido entre sí. Esto se demostró tanto con los electrodos empleados en este trabajo el SPE, el aSPE y el SPE-AuNPs como con un cuarto sensor modificado con carbón vulcan, en todos los casos, el sistema amperométrico basado en el LMP91000 mostró resultados acordes a los del obtenidos con el 910 PSTAT mini de Metrohm. El hecho de probar la operatividad con un electrodo distinto a los proyectados para la determinación de AU permite confirmar que la instrumentación desarrollada podría emplearse en aplicaciones de amperometría que hagan uso de otro tipo de electrodos en el análisis de analitos diferentes al AU.

5.4 Trabajo a futuro.

El desarrollo exitoso de un sistema amperométrico que guarde un comportamiento muy cercano a los equipos comerciales da pie a considerar utilizar el equipo a futuro en dos aplicaciones diferentes. La primera relacionada con la implementación de este como equipo de laboratorio debido a que probó su capacidad de realizar mediciones con electrodos de propiedades diferentes que con el que se probó su optimización. Esta aplicación consideraría la posibilidad de implementar otras técnicas de potencial controlado para el análisis electroquímico como la voltamperometría cíclica, la voltamperometría de pulso cuadrado o la voltamperometría de pulso diferencia, entre otras. Mientras que la segunda aplicación sería el uso de este dispositivo como un potenciostato útil en puntos de atención (*Point of Care*).

La primera vertiente tiene que ver con el diseño de la interfaz gráfica diseñada en LabVIEW, pues podría incluir elementos adicionales que aseguren un control exhaustivo del sistema, situación que no se consideró en este trabajo. Sin embargo, con el fin de realizar una plataforma más generalizada para experimentos electroquímicos se necesitan otros potenciales que no se pueden elegir mediante la interfaz desarrollada, además de hacer posible la elección de otros métodos electroquímicos. En este sentido las dimensiones del potenciostato diseñado continúan siendo una ventaja debido a que el equipo puede moverse con facilidad, a diferencia de la mayoría de dispositivos comerciales.

Con respecto a un dispositivo portátil debería considerarse la importancia de lograr una detección en saliva humana, y que no se abordó en este trabajo dadas las condiciones restrictivas actuales en el manejo de este fluido ocasionadas por el SARS-COV-2. Aun así, las concentraciones que pudieron ser detectadas mediante el sensor desarrollado están dentro los rangos reportados en los que se encuentra el ácido úrico en saliva, y

sería deseable que se utilizara este fluido biológico como matriz de detección en futuros experimentos. Considerando de igual manera el uso del SPE-AuNPs debido a que además de mostrar tener un rango lineal dentro de las concentraciones en los que se encuentra el AU en saliva, obtuvo un mejor desempeño en el potencial de 0.3 V donde se espera haya menos interferencias de especies electroactivas como el ácido ascórbico o la dopamina. Con esto se podría pensar en realizar detecciones para puntos de atención, es decir, al momento de atender al paciente como se hace con las pruebas de glucosa. Por lo que la instrumentación diseñada podría reducir sus dimensiones mediante una fuente de alimentación con dimensiones menores a las usadas en este trabajo, como por ejemplo una batería considerando que la demanda de corriente del potencióstato diseñado es de 170 mA.

Bibliografía.

- [1] M. K. Kutzing y B. L. Firestein, “Altered Uric Acid Levels and Disease States”, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 324, núm. 1, p. 1, Enero 2008, doi: 10.1124/jpet.107.129031.
- [2] R. T. Jiménez y J. G. Puig, “Purine Metabolism in the Pathogenesis of Hyperuricemia and Inborn Errors of Purine Metabolism Associated With Disease”, en *Gout & Other Crystal Arthropathies*, R. Terkeltaub, Ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2012, pp. 36–50.
- [3] D.-H. Kang y R. J. Johnson, “Uric Acid Metabolism and the Kidney”, en *Chronic Renal Disease (Second Edition)*, P. L. Kimmel y M. E. Rosenberg, Eds. Academic Press, 2020, pp. 689–701.
- [4] M. González-Ortiz *et al.*, “Tres desafortunados enemigos de la salud de la población”, *Med Int Méx*, vol. 35, núm. 4, pp. 596–608, 2019.
- [5] M. Hernández Ávila *et al.*, “Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 (ENSANUT MC 2016)”, Instituto Nacional de salud Pública, México, 2016.
- [6] J. A. Vázquez-Ávila, M. Zetina-Martínez, y J. Duarte-Vega, “Hiperuricemia e hipertensión arterial sistémica: ¿Cuál es la relación?”, *Med Int Méx*, vol. 34, núm. 2, pp. 278–287, 2018.
- [7] G. Capasso, Ph. Jaeger, y W. G. Robertson and R. J. Unwin, “Uric Acid and the Kidney: Urate Transport, Stone Disease and Progressive Renal Failure”, *Curr. Pharm. Des.*, vol. 11, núm. 32, pp. 4153–4159, 2005, doi: 10.2174/138161205774913219.
- [8] G. Vargas Ayala, “Ácido úrico y Síndrome metabólico: ‘causa o efecto’”, *Archivos en Medicina Familiar*, vol. 19, núm. 4, pp. 155–169, 2017.
- [9] G. Ragab, M. Elshahaly, y T. Bardin, “Gout: An old disease in new perspective – A review”, *Spec. Issue Uric Acid Life Earth*, vol. 8, núm. 5, pp. 495–511, sep. 2017, doi: 10.1016/j.jare.2017.04.008.
- [10] “Informe mundial sobre la diabetes”, Organización Mundial de la Salud, 2016.

- [11] J. Liu y Y. Duan, "Saliva: A potential media for disease diagnostics and monitoring", *Oral Oncol.*, vol. 48, núm. 7, pp. 569–577, jul. 2012, doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.01.021.
- [12] Q. Wang, X. Wen, y J. Kong, "Recent Progress on Uric Acid Detection: A Review", *Crit. Rev. Anal. Chem.*, pp. 1–17, jul. 2019, doi: 10.1080/10408347.2019.1637711.
- [13] R. Ferin, M. L. Pavão, y J. Baptista, "Rapid, sensitive and simultaneous determination of ascorbic and uric acids in human plasma by ion-exclusion HPLC-UV", *Clin. Biochem.*, vol. 46, núm. 7, pp. 665–669, May 2013, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.01.006.
- [14] Polly. Ellerbe, Alex. Cohen, M. J. Welch, y E. V. White, "Determination of serum uric acid by isotope dilution mass spectrometry as a new candidate definitive method", *Anal. Chem.*, vol. 62, núm. 20, pp. 2173–2177, oct. 1990, doi: 10.1021/ac00219a004.
- [15] K. Tan, G. Yang, H. Chen, P. Shen, Y. Huang, y Y. Xia, "Facet dependent binding and etching: Ultra-sensitive colorimetric visualization of blood uric acid by unmodified silver nanoprisms", *Biosens. Bioelectron.*, vol. 59, pp. 227–232, sep. 2014, doi: 10.1016/j.bios.2014.03.048.
- [16] N. E. Azmi *et al.*, "A simple and sensitive fluorescence-based biosensor for the determination of uric acid using H₂O₂-sensitive quantum dots/dual enzymes", *Spec. Issue Biosens. 2014*, vol. 67, pp. 129–133, May 2015, doi: 10.1016/j.bios.2014.07.056.
- [17] S. Zhao, X. Lan, y Y.-M. Liu, "Gold nanoparticle-enhanced capillary electrophoresis-chemiluminescence assay of trace uric acid", *Electrophoresis*, vol. 30, núm. 15, pp. 2676–2680, Agosto 2009, doi: 10.1002/elps.200900115.
- [18] R. C. Trivedi, L. Rebar, K. Desai, y L. J. Stong, "New ultraviolet (340 nm) method for assay of uric acid in serum or plasma.", *Clin. Chem.*, vol. 24, núm. 4, p. 562, Abril 1978.
- [19] S. RoyChoudhury, Y. Umasankar, J. D. Hutcheson, H. A. Lev-Tov, R. S. Kirsner, y S. Bhansali, "Uricase Based Enzymatic Biosensor for Non-invasive Detection of Uric Acid by Entrapment in PVA-SbQ Polymer Matrix", *Electroanalysis*, vol. 30, núm. 10, pp. 2374–2385, oct. 2018, doi: 10.1002/elan.201800360.

- [20] A. F. D. Cruz, N. Norena, A. Kaushik, y S. Bhansali, "A low-cost miniaturized potentiostat for point-of-care diagnosis", *Biosens. Bioelectron.*, vol. 62, pp. 249–254, Diciembre 2014, doi: 10.1016/j.bios.2014.06.053.
- [21] I. T. Gug, M. Tertis, O. Hosu, y C. Cristea, "Salivary biomarkers detection: Analytical and immunological methods overview", *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 113, pp. 301–316, Abril 2019, doi: 10.1016/j.trac.2019.02.020.
- [22] D. Grassi *et al.*, "Chronic Hyperuricemia, Uric Acid Deposit and Cardiovascular Risk", *Curr. Pharm. Des.*, vol. 19, núm. 13, pp. 2432–2438, 2013.
- [23] H. Alcaíno *et al.*, "Ácido úrico: una molécula con acciones paradójicas en la insuficiencia cardíaca", *Rev. Médica Chile*, vol. 139, núm. 4, pp. 505–515, 2011.
- [24] R. El Ridi y H. Tallima, "Physiological functions and pathogenic potential of uric acid: A review", *J. Adv. Res.*, vol. 8, núm. 5, pp. 487–493, 2017, doi: 10.1016/j.jare.2017.03.003.
- [25] M. Soukup *et al.*, "Salivary uric acid as a noninvasive biomarker of metabolic syndrome", *Diabetol. Metab. Syndr.*, vol. 4, núm. 1, p. 14, Abril 2012, doi: 10.1186/1758-5996-4-14.
- [26] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, y S. R. Crouch, *Fundamentos de química analítica*, Novena edición. México: CENGAGE Learning, 2015.
- [27] C. Wu, L. Zhu, Q. Lu, H. Li, Y. Zhang, y S. Yao, "A dual-signal colorimetric and radiometric fluorescent nanoprobe for enzymatic determination of uric acid by using silicon nanoparticles", *Microchim. Acta*, vol. 186, núm. 12, p. 754, nov. 2019, doi: 10.1007/s00604-019-3862-2.
- [28] M. Amjadi, T. Hallaj, y Z. Kouhi, "An enzyme-free fluorescent probe based on carbon dots – MnO₂ nanosheets for determination of uric acid", *J. Photochem. Photobiol. Chem.*, vol. 356, pp. 603–609, abr. 2018, doi: 10.1016/j.jphotochem.2018.02.002.
- [29] P. Patnaik, "CHROMATOGRAPHIC METHODS", en *Dean's Analytical Chemistry Handbook*, 2a ed., McGraw-Hill Education, p. 1280.
- [30] J. Jen, "Simultaneous determination of uric acid and creatinine in urine by an eco-friendly solvent-free high-performance liquid chromatographic method", *Talanta*, vol. 58, núm. 4, pp. 711–717, oct. 2002, doi: 10.1016/S0039-9140(02)00377-6.

- [31] C. F. Poole, "Chapter 1 - Milestones in the Development of Liquid-Phase Extraction Techniques", en *Liquid-Phase Extraction*, C. F. Poole, Ed. Elsevier, 2020, pp. 1–44.
- [32] C. F. Poole, "1 - Core concepts and milestones in the development of solid-phase extraction", en *Solid-Phase Extraction*, C. F. Poole, Ed. Elsevier, 2020, pp. 1–36.
- [33] P. Patnaik, "MASS SPECTROMETRY", en *Dean's Analytical Chemistry Handbook*, 2a ed., McGraw-Hill Education, p. 1208.
- [34] J. Perello, P. Sanchis, y F. Grases, "Determination of uric acid in urine, saliva and calcium oxalate renal calculi by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry", *J. Chromatogr. B*, vol. 824, núm. 1–2, pp. 175–180, sep. 2005, doi: 10.1016/j.jchromb.2005.07.024.
- [35] I. I. Ebralidze, N. O. Laschuk, J. Poisson, y O. V. Zenkina, "Colorimetric Sensors and Sensor Arrays", en *Nanomaterials Design for Sensing Applications*, Elsevier, 2019, pp. 1–39.
- [36] Y. Liu, M. Yuan, L. Liu, y R. Guo, "A facile electrochemical uricase biosensor designed from gold/amino acid nanocomposites", *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 176, pp. 592–597, ene. 2013, doi: 10.1016/j.snb.2012.08.058.
- [37] F. Settle, *Handbook of Instrumental techniques for Analytical Chemistry*, 1a ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997.
- [38] D.-K. Xu, L. Hua, Z.-M. Li, y H.-Y. Chen, "Identification and quantitative determination of uric acid in human urine and plasma by capillary electrophoresis with amperometric detection", *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.*, vol. 694, núm. 2, pp. 461–466, jul. 1997, doi: 10.1016/S0378-4347(97)00141-2.
- [39] J.-M. Zen, A. Senthil Kumar, y D.-M. Tsai, "Recent Updates of Chemically Modified Electrodes in Analytical Chemistry", *Electroanalysis*, vol. 15, núm. 13, pp. 1073–1087, ago. 2003, doi: 10.1002/elan.200390130.
- [40] S. A. Wring y J. P. Hart, "Chemically modified, carbon-based electrodes and their application as electrochemical sensors for the analysis of biologically important compounds. A review", *Analyst*, vol. 117, núm. 8, pp. 1215–1229, 1992, doi: 10.1039/AN9921701215.

- [41] D. Lakshmi, M. J. Withcombe, F. Davis, P. Sindhu Sharma, y B. Bali Prasad, "Electrochemical Detection of Uric Acid in Mixed and Clinical Samples: A Review", *Electroanalysis*, vol. 2, núm. 23, pp. 305–320, 2011, doi: 10.1002/elan.201000525.
- [42] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, 2a ed. New York: Wiley-VCH, 2001.
- [43] P. M. S. Monk, *Fundamental of Electroanalytical Chemistry*. Manchester, UK: John Wiley & Sons, 2005.
- [44] S. Alegret, M. del Valle, y A. Merkoçi, *Sensores electroquímicos: introducción a los quimiosensores y biosensores: curso teórico-práctico*, 1a ed. Universidad de Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona, 2004.
- [45] P. Kissinger y William R. Heineman, *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, 2a ed. CRC Press, 1996.
- [46] A. Amine y H. Mohammadi, "Amperometry", en *Encyclopedia of Analytical Science*, Elsevier, 2018.
- [47] D. Harvey, "Electrochemical Methods of Analysis", en *Modern Analytical Chemistry*, 1a ed., United States of America: McGraw-Hill, 2000, pp. 461–541.
- [48] A. Hulanicki, S. Glab, y F. Ingman, "Chemical sensors: definitions and classification", *Pure Appl. Chem.*, vol. 63, núm. 9, pp. 1247–1250, 1991, doi: <https://doi.org/10.1351/pac199163091247>.
- [49] J. Janata, *Principles of Chemical Sensors*, 2a ed. New York: Springer Science, 2009.
- [50] J. S. Schultz y R. F. Taylor, *Handbook of Chemical and Biological Sensors*, 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 1996.
- [51] B. Department, "Sensors, Chemical Sensors, Electrochemical Sensors, and ECS", *J. Electrochem. Soc.*, vol. 150, núm. 2, pp. S11–S16, 2003, doi: 10.1149/1.1539051.
- [52] A. A. Ensafi, "Chapter 1 - An introduction to sensors and biosensors", en *Electrochemical Biosensors*, A. A. Ensafi, Ed. Elsevier, 2019, pp. 1–10.
- [53] R. B. Domínguez Cruz, "Plataforma general para construcción, caracterización y prueba de biosensores y sensores químicos", Tesis Doctoral, CINVESTAV, México, 2014.
- [54] P. Gründler, *Chemical Sensors: An Introduction for Scientists and Engineers*, 1a ed. Springer Science & Business Media, 2007.

- [55] Y. Yi *et al.*, “Electrochemical corrosion of a glassy carbon electrode”, *Water Interfaces*, vol. 295, pp. 32–40, oct. 2017, doi: 10.1016/j.cattod.2017.07.013.
- [56] W. E. Van Der Linden y W. Dieker, “Glassy Carbon as Electrode Material In Electroanalytical Chemistry”, *Anal. Chim. Acta*, núm. 119, pp. 1–24, 1980.
- [57] O. D. Renedo, M. A. Alonso-Lomillo, y M. J. A. Martínez, “Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications”, *Talanta*, vol. 73, núm. 2, pp. 202–219, sep. 2007, doi: 10.1016/j.talanta.2007.03.050.
- [58] M. Tudorache y C. Bala, “Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis”, *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 388, núm. 3, pp. 565–578, jun. 2007, doi: 10.1007/s00216-007-1293-0.
- [59] A. P. F. Turner, I. Karube, G. S. Wilson, y P. J. Worsfold, *Biosensors: fundamentals and applications*, 1a ed., vol. 201. New York: Oxford University Press, 1987.
- [60] P. Kanchana y C. Sekar, “EDTA assisted synthesis of hydroxyapatite nanoparticles for electrochemical sensing of uric acid”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 42, pp. 601–607, sep. 2014, doi: 10.1016/j.msec.2014.05.072.
- [61] M. Sajid, N. Baig, y K. Alhooshani, “Chemically modified electrodes for electrochemical detection of dopamine: Challenges and opportunities”, *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 118, pp. 368–385, sep. 2019, doi: 10.1016/j.trac.2019.05.042.
- [62] A. H. Reda y F. G. Gebremeskel, “Determination of Ascorbic Acid in Citrus Sinensis and Ananas Comosus Using Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene) Modified Glassy Carbon Electrode”, *Am. J. Appl. Chem.*, vol. 1, núm. 4, pp. 1–7, 2016, doi: 10.11648/j.ajac.20160401.11.
- [63] S. A. Ozkan, J.-M. Kauffmann, y P. Zuman, *Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 1a ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015.
- [64] T. Xiao, J. Huang, D. Wang, T. Meng, y X. Yang, “Au and Au-Based nanomaterials: Synthesis and recent progress in electrochemical sensor applications”, *Talanta*, vol. 206, núm. July 2019, pp. 120210–120210, 2020, doi: 10.1016/j.talanta.2019.120210.
- [65] C. M. Copley, J. Chen, E. C. Cho, L. V. Wang, y Y. Xia, “Gold nanostructures: a class of multifunctional materials for biomedical applications”, *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, núm. 1, pp. 44–56, 2011, doi: 10.1039/B821763G.

- [66] S. Guo y E. Wang, "Noble metal nanomaterials: Controllable synthesis and application in fuel cells and analytical sensors", *Nano Today*, vol. 6, núm. 3, pp. 240–264, jun. 2011, doi: 10.1016/j.nantod.2011.04.007.
- [67] D. Antuña-Jiménez, M. B. González-García, D. Hernández-Santos, y P. Fanjul-Bolado, "Screen-Printed Electrodes Modified with Metal Nanoparticles for Small Molecule Sensing", *Biosensors*, vol. 10, núm. 2, p. 9, feb. 2020, doi: 10.3390/bios10020009.
- [68] A. Jirasirichote, E. Punrat, A. Suea-Ngam, O. Chailapakul, y S. Chuanuwatanakul, "Voltammetric detection of carbofuran determination using screen-printed carbon electrodes modified with gold nanoparticles and graphene oxide", *Talanta*, vol. 175, pp. 331–337, dic. 2017, doi: 10.1016/j.talanta.2017.07.050.
- [69] M. Chikae *et al.*, "Direct fabrication of catalytic metal nanoparticles onto the surface of a screen-printed carbon electrode", *Electrochem. Commun.*, vol. 8, núm. 8, pp. 1375–1380, ago. 2006, doi: 10.1016/j.elecom.2006.06.019.
- [70] K. Kunpatee, S. Traipop, O. Chailapakul, y S. Chuanuwatanakul, "Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid using graphene quantum dots/ionic liquid modified screen-printed carbon electrode", *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 314, p. 128059, jul. 2020, doi: 10.1016/j.snb.2020.128059.
- [71] J.-C. Chen, H.-H. Chung, C.-T. Hsu, D.-M. Tsai, A. S. Kumar, y J.-M. Zen, "A disposable single-use electrochemical sensor for the detection of uric acid in human whole blood", *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 110, núm. 2, pp. 364–369, oct. 2005, doi: 10.1016/j.snb.2005.02.026.
- [72] Z. Chen, C. Fang, G. Qiu, J. He, y Z. Deng, "Non-enzymatic disposable test strip for detecting uric acid in whole blood", *J. Electroanal. Chem.*, vol. 633, núm. 2, pp. 314–318, ago. 2009, doi: 10.1016/j.jelechem.2009.06.019.
- [73] A. Rana, N. Baig, y T. A. Saleh, "Electrochemically pretreated carbon electrodes and their electroanalytical applications – A review", *J. Electroanal. Chem.*, vol. 833, pp. 313–332, ene. 2019, doi: 10.1016/j.jelechem.2018.12.019.
- [74] G. Cui *et al.*, "Effect of pre-treatment on the surface and electrochemical properties of screen-printed carbon paste electrodes", *The Analyst*, vol. 126, núm. 8, pp. 1399–1403, 2001, doi: 10.1039/b102934g.

- [75] E. Alipour, M. R. Majidi, A. Saadatirad, S. Mahdi-Golabi, y A. M. Alizadeh, “Simultaneous determination of dopamine and uric acid in biological samples on the pretreated pencil graphite electrode”, *Electrochimica Acta*, vol. 91, pp. 36–42, feb. 2013, doi: 10.1016/j.electacta.2012.12.079.
- [76] D. Huang *et al.*, “The determination of uric acid in human body fluid samples using glassy carbon electrode activated by a simple electrochemical method”, *J. Solid State Electrochem.*, vol. 19, núm. 2, pp. 435–443, feb. 2015, doi: 10.1007/s10008-014-2614-9.
- [77] C. Wang *et al.*, “A facile electrochemical sensor based on reduced graphene oxide and Au nanoplates modified glassy carbon electrode for simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid”, *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 204, pp. 302–309, dic. 2014, doi: 10.1016/j.snb.2014.07.077.
- [78] K. Ngamchuea, C. Batchelor-McAuley, y R. G. Compton, “Understanding electroanalytical measurements in authentic human saliva leading to the detection of salivary uric acid”, *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 262, pp. 404–410, jun. 2018, doi: 10.1016/j.snb.2018.02.014.
- [79] J. Aznar-Poveda, J. Lopez-Pastor, A.-J. Garcia-Sanchez, J. Garcia-Haro, y T. Otero, “A COTS-Based Portable System to Conduct Accurate Substance Concentration Measurements”, *Sensors*, vol. 18, núm. 2, p. 539, feb. 2018, doi: 10.3390/s18020539.
- [80] J. Monge, O. Postolache, O. Plopa, A. Trandabat, O. Schreiner, y T. Schreiner, “Glucose Detection in Sweat using Biosensors”, en *2019 E-Health and Bioengineering Conference (EHB)*, Iasi, Romania, nov. 2019, pp. 1–5, doi: 10.1109/EHB47216.2019.8970023.
- [81] S. Vineeth Raj, J. Stanley, y T. G. SatheeshBabu, “Fabrication of a Configurable Multi-Potentiostat for LOC Applications”, *Mater. Today Proc.*, vol. 5, núm. 8, pp. 16732–16739, 2018, doi: 10.1016/j.matpr.2018.06.038.
- [82] Y. Aleeva *et al.*, “Amperometric Biosensor and Front-End Electronics for Remote Glucose Monitoring by Crosslinked PEDOT-Glucose Oxidase”, *IEEE Sens. J.*, vol. 18, núm. 12, pp. 4869–4878, jun. 2018, doi: 10.1109/JSEN.2018.2831779.

- [83] J. Aymerich *et al.*, “Cost-effective smartphone-based reconfigurable electrochemical instrument for alcohol determination in whole blood samples”, *Biosens. Bioelectron.*, vol. 117, pp. 736–742, oct. 2018, doi: 10.1016/j.bios.2018.06.044.
- [84] O. S. Hoilett, J. F. Walker, B. M. Balash, N. J. Jaras, S. Boppana, y J. C. Linnes, “KickStat: A Coin-Sized Potentiostat for High-Resolution Electrochemical Analysis”, *Sensors*, vol. 20, núm. 8, p. 2407, abr. 2020, doi: 10.3390/s20082407.
- [85] T. Instruments, “LMP91000 Sensor AFE System: Configurable AFE Potentiostat for Low-Power Chemical-Sensing Applications”, 2014.
- [86] Texas Instruments, “Ultra-Small, Low-Power, 16-Bit Analog-to-Digital Converter with Internal Reference”. Texas Instruments Incorporated, 2009.
- [87] Espressif Systems, “ESP32-WROOM-32”. Espressif Systems, 2019.
- [88] V. Ganesh y V. Lakshminarayanan, “Scanning Tunneling Microscopy, Fourier Transform Infrared Spectroscopy, and Electrochemical Characterization of 2-Naphthalenethiol Self-Assembled Monolayers on the Au Surface: A Study of Bridge-Mediated Electron Transfer in Ru(NH₃)₆²⁺/Ru(NH₃)₆³⁺ Redox Reactions”, *J. Phys. Chem. B*, vol. 109, núm. 34, pp. 16372–16381, sep. 2005, doi: 10.1021/jp052489u.
- [89] E. T. McAdams, J. Jossinet, R. Subramanian, y R. G. E. McCauley, “Characterization of gold electrodes in phosphate buffered saline solution by impedance and noise measurements for biological applications”, en *2006 International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, Nueva York, USA, sep. 2006, pp. 4594–4597, doi: 10.1109/IEMBS.2006.260406.
- [90] Cold spring harbor protocols, “PBS (pH 7.4)”, *PBS PH 74*, vol. Recipe, 2018, doi: 10.1101/pdb.rec099085.
- [91] F. Stradolini, T. Kilic, A. Di Consiglio, M. Ozsoz, G. De Micheli, y S. Carrara, “Long-term Monitoring of Propofol and Fouling Effect on Pencil Graphite Electrodes”, *Electroanalysis*, vol. 30, núm. 7, pp. 1363–1369, jul. 2018, doi: 10.1002/elan.201700834.
- [92] J. Wang, B. Tian, V. B. Nascimento, y L. Angnes, “Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks”, 23, vol. 43, núm. *Electrochimica Acta*, p. 7, 1998, doi: 10.1016/S0013-4686(98)00092-9.

- [93] C. Martin y C. Grgicak, "The Effect of Repeated Activation on Screen-Printed Carbon Electrode Cards", *ECS Trans.*, vol. 61, núm. 26, pp. 1–8, sep. 2014, doi: 10.1149/06126.0001ecst.
- [94] D.-W. Chou, C.-J. Huang, y N.-H. Liu, "Synthesis of the Small and Uniform Gold Nanoparticles by Electrochemical Technique", *J. Electrochem. Soc.*, vol. 163, núm. 10, pp. D603–D607, 2016, doi: 10.1149/2.0491610jes.
- [95] Linnes Lab, "LMP91000", *LMP91000*, 2016. <https://github.com/LinnesLab/LMP91000.git> (consultado nov. 09, 2020).
- [96] Adafruit, "Adafruit_ADS1015", *Adafruit_ADS1X15*, 07 2020. https://github.com/adafruit/Adafruit_ADS1X15 (consultado nov. 09, 2020).
- [97] P. Pengo y L. Pasquato, "Modified Gold Nanoparticles and Surfaces", en *The Supramolecular Chemistry of Organic-Inorganic Hybrid Materials*, K. Rurack y R. Martínez-Máñez, Eds. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010, pp. 113–154.
- [98] R. G. Compton, E. Laborda, K. R. Ward, y E. Katelhon, *Understanding Voltammetry: Simulation of Electrode processes.*, 2a ed., vol. 1, 1 vol. World Scientific, 2020.
- [99] R. Pallás-Areny y J. G. Webster, *Analog Signal Processing*, 1a ed. John Wiley & Sons, 1999.
- [100] F. Arduini *et al.*, "Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis", *Past Present Future Chall. Biosens. Bioanal. Tools Anal. Chem. Tribute Prof Marco Mascini*, vol. 79, pp. 114–126, may 2016, doi: 10.1016/j.trac.2016.01.032.
- [101] F. C. Vicentini, P. A. Raymundo-Pereira, B. C. Janegitz, S. A. S. Machado, y O. Fatibello-Filho, "Nanostructured carbon black for simultaneous sensing in biological fluids", *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 227, pp. 610–618, may 2016, doi: 10.1016/j.snb.2015.12.094.

Apéndice A. Productos.

Congresos.

2020 XXXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Electroquímica. SMEQ2020



DESARROLLO DE UN BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO PARA LA DETECCIÓN DE ÁCIDO ÚRICO

EA-O3

J. Piedras¹, R. B. Domínguez², J. M. Gutiérrez^{1*}

¹Sección Bioelectrónica, Departamento de Ingeniería Eléctrica, CINVESTAV-IPN.

²Ingeniería y Química de Materiales. Centro de Investigación en Materiales Avanzados.

*E-mail Responsable de la investigación: mgutierrez@cinvestav.mx
berenice.dominguez@cimav.edu.mx

RESUMEN

El ácido úrico (AU) es el producto final del metabolismo de las purinas en humanos y es considerado un biomarcador relevante para enfermedades como: diabetes mellitus, síndrome metabólico y gota. Por tanto, la detección simple, económica y no invasiva de AU es altamente deseable. En este trabajo se presenta el desarrollo de un biosensor electroquímico para la determinación de AU a partir de la enzima uricasa y un sensor serigrafiado de carbón. Para ello, la inmovilización de la enzima sobre el electrodo de carbón se realizó utilizando glutaraldehído como agente entrecruzante y fue corroborada mediante la aparición del pico en -0.42 V por medio de voltametría cíclica. Posteriormente el biosensor fue evaluado ante diferentes concentraciones de AU en el rango de 0 a $480 \mu\text{M}$, alcanzando una detección mínima de $6 \mu\text{M}$. Este resultado sugiere que el biosensor desarrollado es una alternativa prometedora para la detección simple y económica de AU, y que podría potencialmente convertirse en un auxiliar en el análisis de AU en muestras biológicas.

Palabras Clave: ácido úrico, biosensor electroquímico, inmovilización, uricasa.



1. INTRODUCCIÓN

El ácido úrico (AU), producto final del metabolismo de las purinas en humanos, es considerado un biomarcador relevante debido a que en concentraciones anormalmente elevadas puede relacionarse con enfermedades como: diabetes mellitus, síndrome metabólico y gota [1]. Actualmente la detección de este biomarcador se realiza mediante muestras sanguíneas en conjunto con técnicas especializadas como: cromatografía líquida [2], espectrometría de masas [3], colorimetría [4], fluorescencia [5], electroforesis capilar [6] y absorción ultravioleta [7]. Si bien estos métodos analíticos son robustos y confiables, resultan costosos, demandantes de tiempo y requieren de personal especializado para operar [8]. A diferencia de estos, el análisis electroquímico es un método económico y rápido que cuando se usa en conjunto con un biosensor, obtiene una sensibilidad competitiva a la de las técnicas antes mencionadas. Aunado a esto la posibilidad de utilizar métodos de recolección no invasivos hacen de este un método de detección viable para realizar el monitoreo de AU [9].

En este trabajo se presenta la construcción de un biosensor electroquímico para la detección de AU, como una alternativa sensible, rápida, de fácil uso y bajo costo.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1. Compuestos Químicos

Uricasa de candida sp. (2 U/mg), AU, glutaraldehído (8 % en agua w/w), suero de albúmina bovina (BSA) fueron adquiridos en Sigma Aldrich. Se preparó buffer PBS a 0.1 M y pH 7.4 empleando Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 y agua bidestilada.

2.2. Caracterización electroquímica

2.2.1. Sistema Electroquímico

Todos los experimentos se realizaron empleando un potenciostato AUTOLAB de Metrohm, modelo PGSTAT302N y una celda electroquímica de vidrio con capacidad de 20 mL. Como soporte, se utilizaron electrodos serigrafados (SPE) de un solo uso distribuidos por Metrohm (MOD 6.1208.110). Los SPE cuentan con un electrodo de trabajo de carbón de 3 mm de diámetro, un pseudoelectrodo de referencia de Ag y un contraelectrodo de carbón. Todas las

determinaciones electroquímicas se realizaron a temperatura ambiente y utilizando buffer PBS como electrolito de soporte.

2.2.2. Preparación de Electroodos (C/Uox)

Para la construcción del biosensor, el SPE se lavó con una solución de etanol-agua (9:1) para eliminar impurezas de la superficie del electrodo de trabajo. Se preparó una solución enzimática de uricasa (Uox) utilizando 200 μL de PBS, 5 mg de enzima y 2 mg de BSA. Para la inmovilización por entrecruzamiento se depositaron 3 μL de la solución enzimática preparada junto con 1 μL de glutaraldehído sobre la superficie del electrodo de trabajo [9]. Posteriormente los electrodos preparados se dejaron secar a temperatura ambiente durante 20 min y se almacenaron en una solución de PBS (0.1 M, pH 7.4) a 4 $^{\circ}\text{C}$ previo a su uso. La fabricación del electordoy la deposición de la enzima se muestra esquemáticamente en la figura 1.

2.2.3. Evaluación del biosensor C/Uox

El comportamiento electroquímico del biosensor fue evaluado mediante voltamperometría cíclica (VC) en una ventana de potencial de -1 a 0.5 V con una velocidad de escaneo de 10 mV/s, considerando un tiempo de equilibrio de 5 segundos. Se realizaron 3 barridos a fin de observar repetibilidad en la respuesta. Todas las soluciones de AU se prepararon utilizando PBS (0.1 M, pH 7.4), considerando diferentes concentraciones que van desde 0 hasta 480 μM .

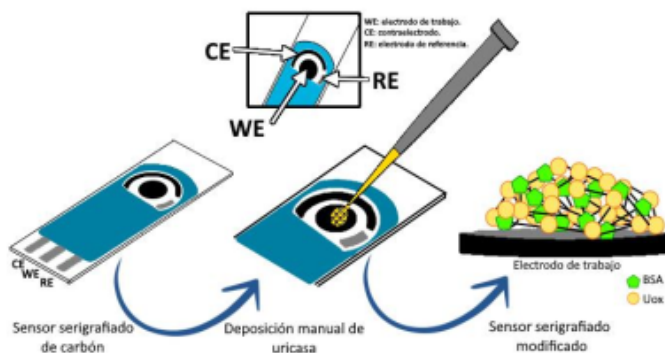


Figura 1. Fabricación manual del biosensor electroquímico C/Uox.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El comportamiento electroquímico del SPE fue probado antes y después de la inmovilización de uricasa con el fin de identificar los cambios en la respuesta del dispositivo. Primeramente, se corroboró mediante VC la ausencia de respuesta en el SPE sin modificar en presencia de PBS y posteriormente se registró la oxidación de AU a un potencial de + 0.4 V [10], tal como se muestra en figura 2a. Lo anterior, a pesar de proporcionar una respuesta cuantificable no garantiza selectividad en la detección de AU ante compuestos que operen en potenciales similares. En contraste el biosensor C/Uox no realiza la determinación de AU de manera directa, si no que utiliza peróxido de hidrógeno (H₂O₂) generado por la reacción enzimática mostrada en la ecuación (1).



Por tanto en el caso del biosensor C/Uox el incremento de la corriente catódica observado en la figura 2b en el potencial de -0.42 V es resultado de la reducción del H₂O₂ generado por la reacción selectiva de la uricasa y el AU. La presencia de esta señal característica indica la correcta inmovilización enzimática por el método de entrecruzamiento.

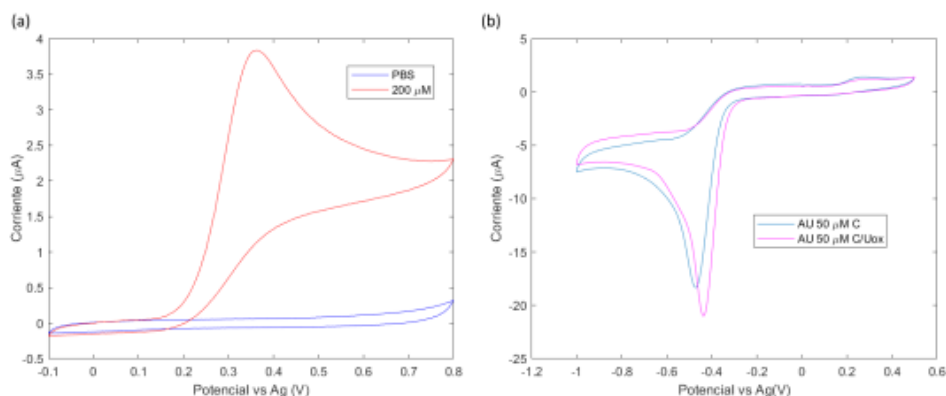


Figura 2. Comportamiento electroquímico de SPE y biosensor C/Uox. (a) Voltametría cíclica con SPE en PBS y AU a 200 μM. (b) Voltametría cíclica con SPE antes y después de inmovilización de uricasa en AU con una concentración de 50 μM.

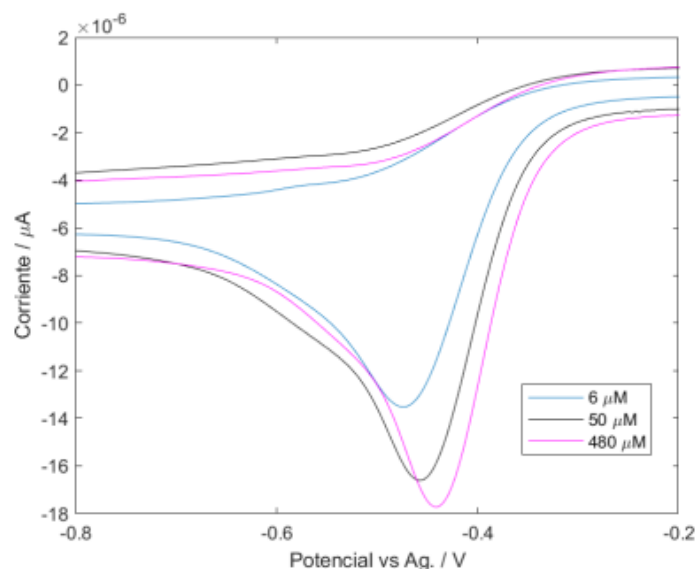


Figura 3. Respuesta en voltametría cíclica en AU en concentraciones de 6 μM , 50 μM y 480 μM del biosensor C/Uox.

Se realizaron pruebas de sensado ante diferentes concentraciones de AU que se muestran en la figura 3. En estos ensayos se muestra el aumento en la corriente catódica de manera proporcional al aumento de concentración de AU desde 0 M hasta 480 μM , siendo la concentración mínima detectada de 6 μM . En estas pruebas preliminares se observa que el rango de detección obtenido con el biosensor C/Uox puede ser de gran interés, ya que corresponde al intervalo establecido en reportes previos para concentraciones de AU en muestras sanguíneas (120 - 420 μM) [11]. Además, la concentración de AU en fluidos biológicos de origen no invasivos como la saliva disminuye a un rango de 100 - 250 μM [11, 12], lo que igualmente se encuentra dentro del rango operativo del biosensor desarrollado. Lo anterior sugiere que el biosensor C/Uox tendría una aplicación potencial como herramienta para la detección de AU en muestras biológicas.

4. CONCLUSIONES

Se construyó un biosensor enzimático para la detección de AU a partir de un SPE como soporte y empleando la inmovilización con glutaraldehído como agente entrecruzante para la enzima uricasa. Las pruebas realizadas sugieren que el método es sencillo, rápido y de bajo costo para la detección de ácido úrico. Debido a que el biosensor fue capaz de detectar concentraciones bajas de AU podría ser utilizado, a futuro, en muestras provenientes de fluidos biológicos.

5. AGRADECIMIENTOS

J. Piedras expresa su gratitud al CONACYT por el apoyo otorgado mediante la beca 926219.

6. REFERENCIAS

- [1] M. K. Kutzing and B. L. Firestein, *Altered Uric Acid Levels and Disease States*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 324, no. 1, p. 1, Enero 2008.
- [2] R. Ferin, M. L. Pavão, and J. Baptista, *Rapid, sensitive and simultaneous determination of ascorbic and uric acids in human plasma by ion-exclusion HPLC-UV*, *Clin. Biochem.*, vol. 46, no. 7, pp. 665–669, May 2013.
- [3] Polly. Ellerbe, Alex. Cohen, M. J. Welch, and E. V. White, *Determination of serum uric acid by isotope dilution mass spectrometry as a new candidate definitive method*, *Anal. Chem.*, vol. 62, no. 20, pp. 2173–2177, Oct. 1990.
- [4] K. Tan, G. Yang, H. Chen, P. Shen, Y. Huang, and Y. Xia, *Facet dependent binding and etching: Ultra-sensitive colorimetric visualization of blood uric acid by unmodified silver nanoprisms*, *Biosens. Bioelectron.*, pp. 227–232, vol. 59 (2014).
- [5] N. E. Azmi *et al.*, *A simple and sensitive fluorescence based biosensor for the determination of uric acid using H₂O₂-sensitive quantum dots/dual enzymes*, *Spec. Issue Biosens.* pp. 129–133, vol. 67 (2015).

- [6] S. Zhao, X. Lan, and Y.-M. Liu, *Gold nanoparticle-enhanced capillary electrophoresis-chemiluminescence assay of trace uric acid*, *Electrophoresis*, pp. 2676–2680, vol. 30 (2009).
- [7] R. C. Trivedi, L. Rebar, K. Desai, and L. J. Stong, *New ultraviolet (340 nm) method for assay of uric acid in serum or plasma.*, *Clin. Chem.*, p. 562, vol. 24 (1978).
- [8] Q. Wang, X. Wen, and J. Kong, *Recent Progress on Uric Acid Detection: A Review*, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, pp. 1–17 (2019).
- [9] J. Kim *et al.*, *Wearable salivary uric acid mouthguard biosensor with integrated wireless electronics*, *Biosens. Bioelectron.*, pp. 1061–1068, vol. 74 (2015).
- [10] P. E. Erden and E. Kılıç, *A review of enzymatic uric acid biosensors based on amperometric detection*, *Talanta*, pp. 312–323, vol. 107 (2013).
- [11] K. Shibasaki, M. Kimura, R. Ikarashi, A. Yamaguchi, and T. Watanabe, *Uric acid concentration in saliva and its changes with the patients receiving treatment for hyperuricemia*, *Metabolomics*, pp. 484–491, vol. 8 (2012).
- [12] M. Soukup *et al.*, *Salivary uric acid as a noninvasive biomarker of metabolic syndrome*, *Diabetol. Metab. Syndr.*, p. 14, vol. 4 (2012).

Apéndice B. Cálculos para las soluciones utilizadas.

Soluciones de ácido úrico en saliva artificial

Las soluciones de ácido úrico a diferentes concentraciones se obtuvieron a partir de una concentración de 1 mM. A continuación, se presentan los cálculos para obtener la solución madre.

- 1 mM

Moles de AU necesarios para tener 10 mM en 100 mL.

$$\frac{1 \text{ mmol AU}}{1 \text{ L}} \times 100 \text{ mL} = 100 \text{ } \mu\text{mol AU} \quad (\text{B.1})$$

Gramos de AU necesarios para tener 1 mmol.

$$x = \frac{168.11 \text{ g AU}}{1 \text{ mol AU}} \times 100 \text{ } \mu\text{mol AU} = 16.811 \text{ mg AU} \quad (\text{B.2})$$

De la ecuación (B.2) se tiene que se deben disolver 16.811 mg de AU en 100 mL de PBS o saliva artificial para obtener una solución a una concentración de 1 mM con un volumen de 100 mL. Cuando la solución se prepara en saliva artificial, es necesario agregar unas gotas de NaOH a 1 M durante la agitación para que el AU se disuelva.

Respecto a las soluciones de menor concentración, estas se obtuvieron a partir de la solución madre y fueron calculadas para un volumen de 25 mL. A continuación, se muestran los cálculos para obtener las soluciones.

– **1 μM**

Moles que debe tener una solución a 1 μM

$$\frac{1 \mu\text{mol AU}}{1 L} \times 25 \text{ mL} = 25 \text{ nmol AU} \quad (\text{B.3})$$

Volumen de la solución de 1 mM necesario

$$V = 25 \text{ nmol} \times \frac{100 \text{ mL}}{100 \mu\text{mol}} = 25 \mu\text{L} \quad (\text{B.4})$$

De la ecuación (B.4) se tiene que se deben tomar 25 μL de la solución de 1 mM de ácido úrico. Este volumen se coloca en un matraz volumétrico y se afora con PBS o saliva artificial. Aforar es hacer que el líquido en el matraz volumétrico llegue hasta la marca circular que indica de manera precisa el volumen del líquido.

– **2.5 μM**

Moles que debe tener una solución a 1 μM

$$\frac{2.5 \mu\text{mol AU}}{1 L} \times 25 \text{ mL} = 62.5 \text{ nmol AU} \quad (\text{B.5})$$

Volumen de la solución de 1 mM necesario

$$V = 62.5 \text{ nmol} \times \frac{100 \text{ mL}}{100 \mu\text{mol}} = 62.5 \mu\text{L} \quad (\text{B.6})$$

De la ecuación (B.6) se tiene que se deben tomar 62.5 μL de la solución de 1 mM de ácido úrico. Este volumen se coloca en un matraz volumétrico y se afora con PBS o saliva artificial.

– **5 μM**

Moles que debe tener una solución a 1 μM

$$\frac{5 \mu\text{mol AU}}{1 L} \times 25 \text{ mL} = 125 \text{ nmol AU} \quad (\text{B.7})$$

Volumen de la solución de 1 mM necesario

$$V = 125 \text{ nmol} \times \frac{100 \text{ mL}}{100 \mu\text{mol}} = 125 \mu\text{L} \quad (\text{B.8})$$

De la ecuación (B.8) se tiene que se deben tomar 125 μL de la solución de 1 mM de ácido úrico. Este volumen se coloca en un matraz volumétrico y se afora con PBS o saliva artificial.

– **50 μM**

Moles que debe tener una solución a 1 μM

$$\frac{50 \mu\text{mol AU}}{1 L} \times 25 \text{ mL} = 1.25 \mu\text{mol AU} \quad (\text{B.9})$$

Volumen de la solución de 1 mM necesario

$$V = 1.25 \mu\text{mol} \times \frac{100 \text{ mL}}{100 \mu\text{mol}} = 1.25 \text{ mL} \quad (\text{B.10})$$

De la ecuación (B.10) se tiene que se deben tomar 1.25 mL de la solución de 1 mM de ácido úrico. Este volumen se coloca en un matraz volumétrico y se afora con PBS o saliva artificial.

– **100 μM**

Moles que debe tener una solución a 1 μM

$$\frac{100 \mu\text{mol AU}}{1 L} \times 25 \text{ mL} = 2.5 \mu\text{mol AU} \quad (\text{B.11})$$

Volumen de la solución de 1 mM necesario

$$V = 2.5 \mu\text{mol} \times \frac{100 \text{ mL}}{100 \mu\text{mol}} = 2.5 \text{ mL} \quad (\text{B.12})$$

De la ecuación (B.12) se tiene que se deben tomar 2.5 mL de la solución de 1 mM de ácido úrico. Este volumen se coloca en un matraz volumétrico y se afora con PBS o saliva artificial.

– **200 μM**

Moles que debe tener una solución a 1 μM

$$\frac{200 \mu\text{mol AU}}{1 L} \times 25 \text{ mL} = 5 \mu\text{mol AU} \quad (\text{B.13})$$

Volumen de la solución de 1 mM necesario

$$V = 5 \mu\text{mol} \times \frac{100 \text{ mL}}{100 \mu\text{mol}} = 5 \text{ mL} \quad (\text{B.14})$$

De la ecuación (B.14) se tiene que se deben tomar 5 mL de la solución de 1 mM de ácido úrico. Este volumen se coloca en un matraz volumétrico y se afora con PBS o saliva artificial.

– **500 μM**

Moles que debe tener una solución a 1 μM

$$\frac{500 \mu\text{mol AU}}{1 L} \times 25 \text{ mL} = 12.5 \mu\text{mol AU} \quad (\text{B.15})$$

Volumen de la solución de 1 mM necesario

$$V = 12.5 \mu\text{mol} \times \frac{100 \text{ mL}}{100 \mu\text{mol}} = 12.5 \text{ mL} \quad (\text{B.16})$$

De la ecuación (B.16) se tiene que se deben tomar 12.5 mL de la solución de 1 mM de ácido úrico. Este volumen se coloca en un matraz volumétrico y se afora con PBS o saliva artificial.

Solución para la electrodeposición de nanopartículas de oro

La solución utilizada para la electrodeposición de nanopartículas de oro se obtuvo a partir de la dilución de HAuCl₄ en H₂SO₄. El H₂SO₄ se preparó con una concentración de 0.5 M y se le agregaron los gramos correspondientes a 1 mM de HAuCl₄. A continuación, se muestran los cálculos utilizados en el desarrollo de las diluciones.

Solución de H₂SO₄: La masa molar de este compuesto es de 98.079 g/mol.

$$\frac{0.5 \text{ mol}}{1 \text{ L}} \times 250 \text{ mL} = 0.125 \text{ mol} \quad (\text{B.17})$$

El resultado obtenido de la ecuación (B.17) se tiene la cantidad de moles que debe haber en 250 mL para tener una concentración de 0.5 M. Ahora se debe calcular a cuánto es equivalente en gramos esa molaridad.

$$\frac{0.125 \text{ mol} \times 98.079 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = 12.25 \text{ g} \quad (\text{B.18})$$

Ya que el H₂SO₄ es líquido para saber cuánto volumen es equivalente a 12.25 g se utiliza el valor de densidad que es 1.83 g/mL.

$$\frac{12.25 \text{ g} \times 1 \text{ mL}}{1.83 \text{ g}} = 6.69 \text{ mL} \quad (\text{B.19})$$

Estos 6.69 mL deben diluirse con agua bidestilada aforando a 250 mL.

HAuCl₄: La masa molar de este ácido es 339.785 g/mol.

$$\frac{0.1 \text{ mmol}}{1 \text{ L}} = 25 \text{ } \mu\text{mol} \quad (\text{B. 20})$$

El resultado que se obtuvo en la ecuación (B.20) debe convertirse a gramos.

$$\frac{25 \text{ } \mu\text{mol} \times 339.785 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = 8.494 \text{ mg} \quad (\text{B. 21})$$

Se deben diluir 8.494 mg de HAuCl₄ en 250 mL de H₂SO₄ a 0.5 M.

Concentraciones de AU añadidas en amperometría.

Para este método analítico se utilizó una celda de 10 mL con agitación suave, iniciando con un volumen de 8 mL de PBS o saliva artificial y haciendo adiciones de 200 μ L de una solución madre con una concentración 1 mM de AU. A continuación, se desglosan los cálculos de concentraciones.

Se debe obtener primero la cantidad de moles contenidos en una solución de 50 mL a 1 mM de AU.

$$\frac{1 \text{ mmol}}{1 \text{ L}} \times 50 \text{ mL} = 50 \text{ } \mu\text{mol} \quad (\text{B. 22})$$

De la ecuación (B.22) se tiene que en una solución de 1 mM de 50 mL hay 50 μ mol. Ahora se debe saber cuántos moles hay en una adición de 200 μ L de la misma solución.

$$\frac{50 \text{ } \mu\text{mol} \times 200 \text{ } \mu\text{L}}{50 \text{ mL}} = 200 \text{ nmol} \quad (\text{B. 23})$$

Entonces cada que se hace una adición de 200 μL de la solución de 1mM de AU se están añadiendo 200 nmol de AU. Si el volumen inicial es de 8 mL entonces la concentración final después de una adición es:

$$X = \frac{200 \text{ nmol}}{8 \text{ mL} + 200 \mu\text{L}} = 24.39 \mu\text{M} \quad (\text{B. 24})$$

Apéndice C. Manual de usuario interfaz gráfica.

Como se mencionó en el desarrollo, la interfaz gráfica se realizó por medio de LabVIEW. Este apartado tiene como intención explicar su uso y se encuentra dividido en dos partes que son el inicio de experimentos y el fin de estos.

Inicio de experimentos.

En este apartado se hablará de los parámetros necesarios para iniciar un experimento de amperometría mediante la interfaz.

Conexión del potencióstato LMP91000.

La conexión del potencióstato se hace mediante el puerto USB de la computadora. El potencióstato posee un puerto micro USB por lo que será necesario un cable microUSB – USB. En la figura C.1A se presenta el puerto del potencióstato, mientras que en la figura B.1B se muestra la conexión con el cable USB-microUSB.

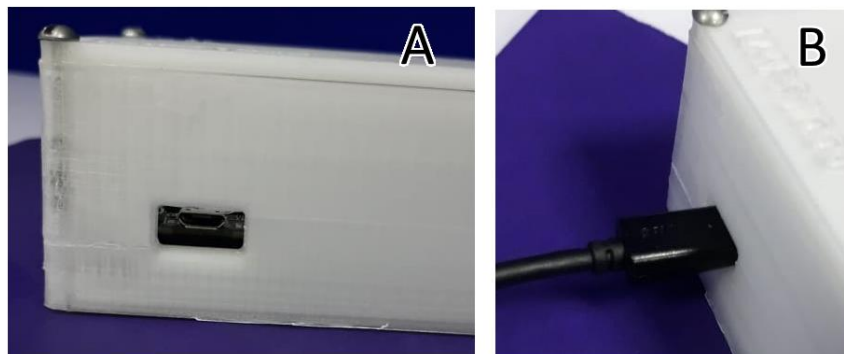


Figura C. 1 Puerto micro USB de la tarjeta ESP32.

Una vez conectado el potencióstato a la computadora en la interfaz se debe elegir el puerto serial con el que se reconoce al dispositivo. Si este no aparece deberá seleccionar *Refresh* para que se vuelva a realizar un escaneo en los dispositivos conectados mediante puerto serial (véase Figura C.2).

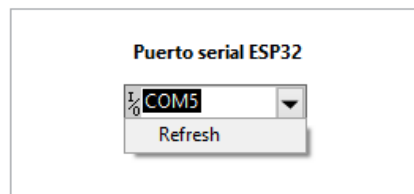


Figura C. 2 Menú de selección de puerto serial.

Selección de potencial.

Una vez seleccionado el puerto serial, continúa con la selección de potencial. Esta aplicación solo posee dos potenciales que son 0.3 V y 0.4 V mismos que se seleccionan con el menú que se muestra en la figura C.3

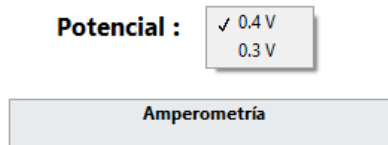
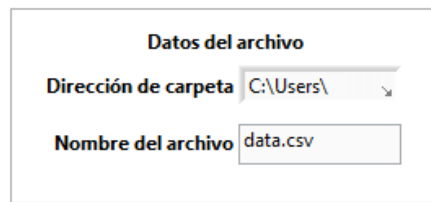


Figura C. 3 Menú de selección de potencial.

Datos del archivo.

Antes de poder iniciar el experimento se debe especificar la ruta de la carpeta y el nombre del archivo donde se guardan los datos.



Datos del archivo

Dirección de carpeta C:\Users\

Nombre del archivo data.csv

Figura C. 4 Selección de ruta de carpeta y nombre del archivo.

En la figura C.4 se muestra cómo deben ingresarse los datos. En la parte llamada “Dirección de carpeta” se coloca la ruta de la carpeta y en la parte cuyo nombre es “Nombre del archivo” simplemente se coloca el nombre del archivo que se creará para contener la información del experimento. Es importante que el tipo de archivo sea .csv.

Inicio del experimento.

Una vez elegidos los parámetros anteriores, se puede comenzar con el experimento mediante el botón *Run*.

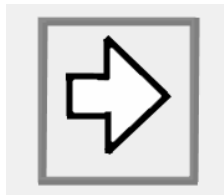


Figura C. 5 Botón Run en el ambiente de LabVIEW.

Fin de experimentos.

El experimento termina cuando el tiempo se cumple o al presionar el botón *stop*. El archivo con los datos se encontrará en la carpeta designada y con el nombre que se le asignó desde el inicio.