



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

DOCTORADO EN QUÍMICA

TESIS

DESARROLLO DE METODOLOGÍAS VOLTAMPEROMÉTRICAS BASADAS EN
SENSORES NO ENZIMÁTICOS MODIFICADOS CON NANOESTRUCTURAS DE
ÓXIDOS METÁLICOS O MOF PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA Y
ÁCIDO ÚRICO

PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN QUÍMICA

PRESENTA:
DANIEL HERNÁNDEZ RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. GIAAN ARTURO ÁLVAREZ ROMERO

COMITÉ TUTORIAL:
DR. LUIS HUMBERTO MENDOZA HUIZAR
DR. CARLOS ANDRÉS GALÁN VIDAL
DRA. GUADALUPE YOSELIN AGUILAR LIRA

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO, MÉXICO. JULIO DE 2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

School of Engineering and Basic Sciences

Área Académica de Química

Department of Chemistry

Número de control: ICBI-AAQ/1517/2023

Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar de la UAEH

El Comité Tutorial del trabajo de tesis titulado "DESARROLLO DE METODOLOGÍAS VOLTAMPEROMÉTRICAS BASADAS EN SENSORES NO ENZIMÁTICOS MODIFICADOS CON NANOESTRUCTURAS DE ÓXIDOS METÁLICOS O MOF PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA Y ÁCIDO ÚRICO", realizado por el sustentante DANIEL HERNÁNDEZ RAMÍREZ con número de cuenta 415660 perteneciente al programa del DOCTORADO EN QUÍMICA, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo con lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Por lo que la sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente

"Amor, Orden y Progreso"

Mineral de la Reforma, Hidalgo a 14 de junio de 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO


Dr. Otilio Arturo Acavedo Sandoval
Director del ICBI




Dr. Gaaan Arturo Álvarez Romero
Director de tesis


Dra. Guadalupe Yoselin Aguilar Lira
Miembro del Comité Tutorial

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Área Académica de Química


Dr. Luis Humberto Mendoza Huizar
Miembro del Comité Tutorial


Dr. Carlos Andrés Galán Vidal
Miembro del Comité Tutorial

Ciudad del Conocimiento
Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia
Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo,
México. C.P. 42184
Teléfono: +52 (771) 71 720 00 ext. 2200, 2201
Fax 8502
aaq_icbi@uaeh.edu.mx



www.uaeh.edu.mx

Agradecimiento

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de posgrado otorgada (Número de Apoyo:733056) para culminar este proyecto.

Al Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y a la Universidad Tecnológica del Sureste de Veracruz por el apoyo institucional brindado.

Al director de tesis, Dr. Giaan Arturo Álvarez Romero por su mentoría para el desarrollo de este trabajo de investigación y difusión de los resultados.

A los integrantes del comité tutorial (Dr. Huizar, Dr. Galán y Dra. Lupita) por su apoyo y comentarios que enriquecieron este trabajo.

Dra. Noemí, Dr. Guevara, Dr. Israel, Dr. José Antonio, Dra. Miriam, Dra. Luisa, Dra. Irma, Dr. Galán y Dr. Giaan por su valioso aporte de conocimiento en las asignaturas cursadas en el doctorado, que contribuyeron en gran medida en mi desarrollo académico.

Dra. Páez, Dra. Miriam, Dr. Juan Francisco, Dra. Gris, Dra. Gabriela, Dr. Prisciliano, Tane, Hernán, David, Abril, Yair, Circe, Karen, Angy y Ricardo, gracias por sus consejos, platicas y convivencia durante mi estancia en el ICBI.

A mi mamá, papá hermanos, hermana, sobrinos y sobrinas que nos alentaron a culminar este objetivo profesional.

Y en especial a *Elenita Rebolledo* gracias por acompañarme en este gran reto y por convertirte en mi compañera de clases, apoyo emocional, par académico, amiga de viajes, socia, coaching y principalmente por ser mi compañera de vida. Muchas gracias, sin tu acompañamiento hubiera sido más complicado.

Algunos de los resultados del presente trabajo han sido presentados en los siguientes foros científicos:

XXV Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica 2022. **Desarrollo de un sensor composite no enzimático para ácido úrico basado en nanopartículas de Bi_2O_3** "

En el marco del XXV Congreso Virtual de la SIBAE en México realizado del 3 al 6 de abril de 2022.

XXXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Electroquímica y el 14th Meeting of the Mexican Section of the Electrochemical Society. **Determinación de glucosa mediante sensores no enzimáticos basados en nanopartículas de Fe_2O_3** . Celebrado del 14-15 de octubre del 2021 en la CDMX, México.

XXXIV Congreso Nacional de Química Analítica. **Construcción de un sensor electroquímico no enzimático tipo composite basado en estructuras de MOF MIL-100 Mn para la determinación de glucosa**. Celebrado del 21 al 23 de junio del 2022 en la ciudad de Guanajuato, Guanajuato.

A partir de la presente investigación se han realizado las siguientes publicaciones:

Hernández-Ramírez, D., Mendoza-Huizar, L. H., Galán-Vidal, C. A., Aguilar-Lira, G. Y., & Álvarez-Romero, G. A. (2021). Trends on the Development of Non-Enzymatic Electrochemical Sensors Modified with Metal-Oxide Nanostructures for the Quantification of Uric Acid. *Journal of the Electrochemical Society*, 168(5), 057522. doi: 10.1149/1945-7111/abf8d5

Hernández-Ramírez, D., Mendoza-Huizar, L. H., Galán-Vidal, C. A., Aguilar-Lira, G. Y., & Álvarez-Romero, G. A. (2022). Development of a Non-Enzymatic Glucose Sensor Based on Fe₂O₃ Nanoparticles-Carbon Paste Electrodes. *Journal of The Electrochemical Society*, 169(6), 067507. doi: 10.1149/1945-7111/ac735c

Hernández-Ramírez, D., Mendoza-Huizar, L. H., Galán-Vidal, C. A., Aguilar-Lira, G. Y., & Álvarez-Romero, G. A. (2022). Trends in the Development of Non-Enzymatic Electrochemical Sensors Modified with a Metal-Organic Framework for Quantification of Uric Acid. *Journal of The Electrochemical Society*, 169(5), 057511. doi: 10.1149/1945-7111/ac6c0d

Introducción

La presencia de glucosa y ácido úrico en el organismo humano se conoce con el concepto de glicemia y uricemia, respectivamente. La glucosa es la principal fuente de energía en el ser humano y el ácido úrico es un potente antioxidante que contribuyen a la salud humana. Desafortunadamente, valores anormales de estas biomoléculas se relacionan estrechamente en diversas enfermedades, por ejemplo, diabetes, problemas renales, dificultades cardiovasculares, etcétera.

Para prevenir estas enfermedades es necesario realizar mediciones frecuentes de las concentraciones de glucosa y ácido úrico para tomar acciones de salud en el ser humano y mantener estos metabolitos en niveles normales.

La cuantificación de glucosa y ácido úrico en muestras fisiológicas se realiza principalmente por técnicas espectrofotométricas a través de mediciones indirectas con el empleo de la enzima glucosa oxidasa y uricasa, respectivamente. Aunque estas técnicas han resultado ser exactas y precisas, sus desventajas se resumen en: alto costo de operación, instrumentación sofisticada y/o vulnerabilidad de la enzima a cambios de temperatura o humedad.

Estas limitantes propician un área de oportunidad para el desarrollo de sensores electroquímicos no enzimáticos modificados con materiales inertes de bajo costo y accesibles, como las nanopartículas de óxidos metálicos o Metal-Organic Frameworks, que han demostrado capacidad electrocatalítica para la detección de biomoléculas en muestras fisiológicas.

En la presente tesis se reporta el desarrollo de metodologías analíticas no enzimáticas para la cuantificación de los niveles de glucosa y ácido úrico en muestras de orina humana, el documento se divide en tres capítulos:

En el primer capítulo se presentan los antecedentes generales y se describe la importancia de la glucosa y ácido úrico en el ser humano, la necesidad de cuantificar los niveles de glicemia y uricemia debido a los problemas ocasionados por niveles anormales, las

limitaciones de las técnicas enzimáticas para su cuantificación, el desarrollo de metodologías electroquímicas libres de enzimas empleando electrodos de pasta de carbono modificados con materiales inertes de bajo costo para su empleo en muestras fisiológicas, y por último, las ventajas al combinar las redes neuronales artificiales y técnicas electroquímicas en la cuantificación de biomoléculas en presencia de interferentes que presentan señales superpuestas.

En el segundo capítulo se describe la metodología empleada para la construcción de los sensores de pasta de carbono sin modificar y modificados, optimización del porcentaje de modificante en la pasta de carbono, optimización del pH del medio de la solución electrolítica, uso del diseño Box-Behnken para optimizar los parámetros relacionados con la técnica electroanalítica, caracterización analítica de los sensores electroquímicos propuestos, evaluación de la funcionalidad de los sensores y por último la implementación de una red neuronal artificial para cuantificar ácido úrico en presencia de diversos interferentes.

En el tercer capítulo, se reportan los resultados obtenidos en el desarrollo de las metodologías voltamperométricas optimizadas para a) cuantificación de glucosa empleado un sensor de pasta de carbono modificado con nanopartículas de Fe_2O_3 , b) cuantificación de glucosa empleado un sensor de pasta de carbono modificado con MOF MIL-100 Mn, c) cuantificación de ácido úrico empleado un sensor de pasta de carbono modificado con nanopartículas de Bi_2O_3 y por ultimo d) implementación de una red neuronal artificial para la cuantificación de ácido úrico en presencia de interferentes.

Las metodologías voltamperométricas optimizadas y desarrolladas en esta investigación son propuestas que mostraron alta selectividad hacia el analito, excelente repetibilidad-reproducibilidad y funcionalidad en muestras de orina convirtiéndolas en una alternativa para su empleo en ensayos clínicos.

Índice

Introducción

1	CAPÍTULO I. ANTECEDENTES, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	19
1.1	La importancia del monitoreo clínico de la glucosa y ácido úrico.....	20
1.1.1	Glucosa.	20
1.1.2	Ácido úrico.	21
1.2	Técnicas analíticas convencionales para cuantificar glucosa y ácido úrico.....	22
1.2.1	Técnicas analíticas convencionales para cuantificar glucosa.	22
1.2.2	Técnicas analíticas convencionales para cuantificar ácido úrico.	24
1.3	Técnicas electroquímicas para cuantificar biomoléculas.	25
1.3.1	Voltamperometría.	25
1.3.1.1	Voltamperometría de barrido lineal	27
1.3.2	Voltamperometría cíclica.....	28
1.3.3	Voltamperometría diferencial de pulso.	29
1.3.4	Sensores electroquímicos para la determinación de glucosa y ácido úrico. 31	
1.4	Materiales inertes empleados en la modificación de sensores electroquímicos... 34	
1.4.1	Nanopartículas metálicas.	34
1.4.2	Nanoestructuras de óxidos metálicos.....	35
1.4.3	Nanoestructuras de óxido de hierro (III).	35
1.4.4	Nanoestructuras de óxido de bismuto (III).	36
1.4.5	Estructuras metal-orgánicas.....	36
1.5	Sensores electroquímicos no enzimáticos para la determinación de glucosa y ácido úrico.....	39
1.6	Diseño de Experimentos	41
1.6.1	Diseño de Experimentos Box-Behnken.....	42
1.6.2	Redes neuronales artificiales.	44
1.6.3	Perceptrón multicapa.	46
1.7	Justificación.	53
1.8	Objetivo general y objetivos específicos	54
2	CAPÍTULO II. MARCO METODOLÓGICO	56
2.1	Reactivos.	57
2.2	Mediciones electroquímicas.....	57
2.3	Preparación de los electrodos de pasta de carbono.	58
2.4	Estudio del rendimiento electroquímico del CPE modificado	59

2.5	Optimización del porcentaje de modificante en CPE.	60
2.6	Optimización del pH del medio electrolítico.	60
2.7	Evaluación del efecto de la concentración del analito en la respuesta electroanalítica.	61
2.8	Diseño Box-Behnken para la optimización de DPV.	62
2.9	Caracterización analítica de los métodos desarrollados.	62
2.9.1	Intervalo de linealidad.	62
2.9.2	Sensibilidad analítica.	63
2.9.3	Límite de cuantificación (LOQ).	63
2.9.4	Límite de detección (LOD).	63
2.9.5	Repetibilidad.	64
2.9.6	Reproducibilidad.	64
2.9.7	Selectividad.	64
2.10	Análisis de muestras reales.	65
2.11	Red neuronal artificial.	66
2.11.1	Mediciones electroquímicas.	66
2.11.2	Mezclas para la etapa de entrenamiento y prueba.	66
2.11.3	Red Neuronal Artificial para cuantificar ácido úrico en presencia de interferentes.	68
3	CAPÍTULO III. RESULTADOS	70
3.1	Sensor no enzimático modificado con nanopartículas de Fe₂O₃ para cuantificar glucosa.	71
3.1.1	Estudio del sistema electroquímico mediante CV.	71
3.1.2	Optimización del porcentaje de Fe ₂ O ₃ -NPs en CPE.	74
3.1.3	Optimización del pH de trabajo para el sistema electroquímico.	75
3.1.4	Optimización de los parámetros de la DPV.	76
3.1.5	Curva de calibración y parámetros analíticos.	78
3.1.6	Repetibilidad, reproducibilidad, estabilidad del sensor y selectividad.	80
3.1.7	Análisis en muestras reales.	81
3.2	Sensor de pasta de carbono modificado con MOF-MIL 100 manganeso para cuantificar glucosa.	82
3.2.1	Estudio del sistema electroquímico mediante CV.	82
3.2.2	Optimización del porcentaje de MOF MIL-100 Mn en la mezcla composite del CPE.	85
3.2.3	Optimización de pH del electrolito soporte.	86
3.2.4	Optimización de los parámetros DPV.	87

3.2.5	Curva de calibración y parámetros analíticos.	89
3.2.6	Repetibilidad, reproducibilidad, estabilidad y selectividad.	90
3.2.7	Análisis en muestras reales.	92
3.3	Sensor de pasta de carbono modificado con nanopartículas de Bi₂O₃ para determinar ácido úrico.	92
3.3.1	Estudio del sistema electroquímico mediante CV.	92
3.3.2	Optimización del porcentaje de Bi ₂ O ₃ -NPs en el CPE.	95
3.3.3	Optimización de pH del electrolito soporte.	96
3.3.4	Optimización de los parámetros de la DPV.	97
3.3.5	Determinación de los parámetros analíticos de la metodología optimizada.	100
3.3.6	Repetibilidad, reproducibilidad, estabilidad y selectividad.	102
3.3.7	Análisis en muestras reales.	103
3.4	Red neuronal artificial para la cuantificación de ácido úrico en presencia de ácido ascórbico, paracetamol y ácido oxálico.	103
3.4.1	Mediciones electroquímicas del AU en presencia de los interferentes. .	104
3.4.2	Etapa de entrenamiento y prueba mediante la Red Neuronal artificial.	104
4	Conclusiones.	108
5	Perspectivas.	110
6	Referencias bibliográficas.	111

Índice de figuras

Figura 1.1 Representación de la estructura química de la D-glucosa.	21
Figura 1.2 Representación de la estructura química del ácido úrico.	22
Figura 1.3 Representación de un sistema de tres electrodos.	26
Figura 1.4 Representación de un voltamperograma.	27
Figura 1.5 Programa de barrido de potencial positivo en voltamperometría lineal.	27
Figura 1.6 Gráfico obtenido mediante voltamperometría de barrido lineal.	28
Figura 1.7 Programa de potencial en voltamperometría cíclica.	28
Figura 1.8 Gráfico obtenido mediante voltamperometría cíclica.	29
Figura 1.9 Programa de potencial en voltamperometría diferencial de pulso.	30
Figura 1.10 Gráfico obtenido mediante voltamperometría diferencial de pulso.	30
Figura 1.11 Representación de elementos en un sensor electroquímico.	31
Figura 1.12 Medición de glicemia empleando un glucómetro comercial.	33
Figura 1.13 Representación de estructuras MOF 1D, 2D y 3D.	37
Figura 1.14 Representación de estructuras MOF MIL-100 Mn.	38
Figura 1.15 Oxidación no enzimática de la glucosa en medio básico	40
Figura 1.16 Representación de un diseño Box-Behnken para tres factores.	42
Figura 1.17 Representación de una red neuronal biológica.	45
Figura 1.18 Representación de la red neuronal artificial.	45
Figura 3.1 CVs de CPE y el 10% Fe ₂ O ₃ -NPs/CPE en solución alcalina sin glucosa	71
Figura 3.2 CVs de CPE y 10% Fe ₂ O ₃ -NPs en 0.1 mM de glucosa en 0.1 M KCl (pH 12.8).....	72
Figura 3.3 Mecanismo de respuesta electroquímica hacia glucosa usando el Fe ₂ O ₃ -NPs/CPE.	73
Figura 3.4 Optimización del porcentaje de Fe ₂ O ₃ -NPs en el CPE en 0.1 mM de glucosa a pH 12.8.	74
Figura 3.5 Optimización de pH del medio usando el 10% Fe ₂ O ₃ -NPs/CPE en 0.1 mM de glucosa (0.1 M KCl a pH 12.8).	75
Figura 3.6 Gráfico de superficie de respuesta para la optimización de la señal de respuesta mediante DBB en el proceso de oxidación anódica de la glucosa empleando Fe ₂ O ₃ - NPs/CPE.	77
Figura 3.7 Curva de calibración de 10% Fe ₂ O ₃ /CPE-NPs para glucosa (medio básico) con parámetros optimizados DPV.	79
Figura 3.8 CVs obtenidos utilizando CPE y 10% MOF MIL-100 Mn/CPE en ABS 0.1 M (pH 5.5)...	82
Figura 3.9 CVs obtenidos utilizando CPE y 10% MOF MIL-100 Mn/CPE en 1 μM glucosa (ABS 0,1 M, pH 5.5).	84
Figura 3.10 LSVs obtenidos utilizando CPE y MOF MIL-100 Mn/CPE en ABS y en Glc (disuelta en 0.1 M ABS, pH 5.5).	84
Figura 3.11 Mecanismo de respuesta electroquímica hacia glucosa usando el MOF MIL-100 Mn/CPE.	85

Figura 3.12 Optimización de MOF MIL-100 dentro del CPE usando una solución de 1 μ M Glc (disuelta en ABS, pH 5.5).	86
Figura 3.13 Optimización del pH del usando MOF MIL-100 Mn/CPE en 1 μ M de Glc (disuelta en 0.1 M ABS).	87
Figura 3.14 Gráfico de superficie de respuesta para la optimización de la señal de respuesta mediante DBB en el proceso de oxidación anódica de la glucosa empleando MOF MIL-100 Mn/CPE.	89
Figura 3.15 Curva de calibración obtenida usando MOF MIL-100 Mn/CPE.	90
Figura 3.16 CVs obtenidos usando el CPE y 10% Bi ₂ O ₃ -NPs/CPE en ABS 0.1 M (pH 5.5).	93
Figura 3.17 CVs obtenidos usando CPE y 10% Bi ₂ O ₃ -NPs/CPE en AU 0.5 mM (disuelto en ABS 0.1 M, pH 5.5).	94
Figura 3.18 LSVs obtenidos con el CPE y el Bi ₂ O ₃ -NPs/CPE en ausencia de AU (ABS 0.1 M, pH 5.5.) y 0.5 mM (disuelto en ABS 0.1 M a pH 5.5).	95
Figura 3.19 LSVs obtenidos al considerar diferentes porcentajes de Bi ₂ O ₃ -NPs en el CPE, en 0.5 mM de AU (disuelto en ABS 0.1 M, pH 5.5).	96
Figura 3.20 A) LSVs registrados a diferentes valores de pH usando el Bi ₂ O ₃ -NPs/CPE en 0.5 mM UA (disuelto en ABS 0.1 M) y B) gráfico de potencial de pico anódico vs pH.	97
Figura 3.21 Gráfico de superficie de respuesta para la optimización de la señal de respuesta mediante DBB en el proceso de oxidación anódica de la Glc empleando Bi ₂ O ₃ -NPs/CPE.	100
Figura 3.22 Curva de calibración obtenida usando la metodología optimizada para determinar AU.	101
Figura 3.23 DPVs de mezclas 0.1 mM AO, 0.1 mM AA, 0.1 mM AU y 0.1 mM PAR usando 10% Bi ₂ O ₃ -NPs/CPE.	104
Figura 3.24 DPVs obtenidos para las etapas de A) entrenamiento y B) prueba de la RNA.	105
Figura 3.25 Valor de coeficiente de correlación múltiple (R) en la etapa de entrenamiento (A) y etapa de prueba (B) de la RNA.	105
Figura 3.26 Valor del error mínimo cuadrado (EMC) en la etapa de entrenamiento (A) y etapa de prueba (B) de la RNA.	106
Figura 3.27 Valor de coeficiente de correlación múltiple (R) en la etapa de entrenamiento (A) y etapa de prueba (B) de la RNA para el ácido úrico (AU).	106

Índice de tabla.

Tabla 1.1 Sensores no enzimáticos modificados con nanopartículas de óxidos metálicos o MOF para cuantificar glucosa	39
Tabla 1.2 Sensores no enzimáticos modificados con nanopartículas de óxidos metálicos o MOF para cuantificar AU	40
Tabla 1.3 Parámetros estadísticos para evaluación del modelo en el diseño Box-Behnken	43
Tabla 1.4 Funciones de activación empleadas en redes neuronales artificiales.	49
Tabla 1.5 Funciones de entrenamiento para redes neuronales artificiales.	51
Tabla 2.1 Sistemas electroquímicos para las metodologías voltamperométricas.	58
Tabla 2.2 Condiciones para evaluar el rendimiento electroquímico de los CPE modificados	59
Tabla 2.3 Condiciones para la optimización del porcentaje de modificante en el CPE.	60
Tabla 2.4 Condiciones de optimización del pH del medio electrolítico.	61
Tabla 2.5 Condiciones de evaluación del efecto de la concentración del analito en la respuesta electroanalítica	61
Tabla 2.6 Condiciones iniciales de las variables de la DPV para el diseño Box-Behnken.....	62
Tabla 2.7 Mezclas de AU, PAR, AA y AO en el entrenamiento de la RNA.	67
Tabla 2.8 Mezcla de AU, PAR, AA y AO en la etapa de prueba de la RNA.	68
Tabla 2.9 División de datos para validación cruzada usando K-fold.	69
Tabla 3.1 Experimentos para la optimización de DPV usando Fe ₂ O ₃ -NPs/CPE.....	76
Tabla 3.2 Valores óptimos para los parámetros DPV usando Fe ₂ O ₃ -NPs/CPE.	78
Tabla 3.3 Parámetros analíticos de sensores ferrosos para glucosa.	79
Tabla 3.4 Cuantificación de glucosa en orina humana usando la metodología optimizada con Fe ₂ O ₃ -NPs /CPE.	81
Tabla 3.5 Experimentos para la optimización de DPV usando MOF MIL-100 Mn/CPE.	88
Tabla 3.6 Valores óptimos para los parámetros DPV usando MOF MIL-100 Mn/CPE.	89
Tabla 3.7 Parámetros analíticos de sensores para glucosa basados en MOF.	90
Tabla 3.8 Cuantificación de glucosa en orina humana usando MOF MIL-100 Mn/CPE	92
Tabla 3.9 Experimentos para la optimización de DPV usando Bi ₂ O ₃ -NPs/CPE.....	99
Tabla 3.10 Valores óptimos para los parámetros DPV usando Bi ₂ O ₃ -NPs/CPE.....	99
Tabla 3.11 Parámetros analíticos de sensores para AU basados en óxidos metálicos.	101
Tabla 3.12 Cuantificación de ácido úrico en orina humana usando Bi ₂ O ₃ -NPs/CPE	103
Tabla 3.13 Rendimiento de RNA para cuantificar ácido úrico en presencia de interferentes.	107
Tabla 3.14 Cuantificación de AU en orina humana usando la RNA-DVP (Bi ₂ O ₃ -NPs/CPE).	107
Tabla 4.1 Resumen de resultados de las metodologías desarrolladas	109

Índice de ecuación

Ecuación 1. Mecanismo de oxidación enzimática de la glucosa.	23
Ecuación 2. Mecanismo de oxidación enzimática del ácido úrico.	24
Ecuación 3 Mecanismo de oxidación enzimática de glucosa en sensor electroquímico.....	32
Ecuación 4. Mecanismo de oxidación enzimática de ácido úrico en sensores electroquímicos.	32
Ecuación 5. Mecanismo de oxidación no enzimática de ácido úrico en sensor electroquímico.	41
Ecuación 6. Representación del modelo polinomial obtenido en el diseño Box-Behnken.	42
Ecuación 7. Modelo lineal para el ajuste de la curva de calibración (ecuación de la pendiente).	62
Ecuación 8. Determinación de límite de cuantificación (LOQ).....	63
Ecuación 9. Determinación de límite de detección (LOD).	64
Ecuación 10. Error relativo porcentual para la evaluación de la selectividad.	65
Ecuación 11. Estadístico de prueba t-student pareada.	66
Ecuación 12. Cálculo del error medio cuadrático (EMC) para la red neuronal artificial.	69
Ecuación 13. Porcentaje de recobro (PR) aplicado a la red neuronal artificial.....	69
Ecuación 14. Mecanismo de oxidación no enzimática de la glucosa empleando Fe_2O_3 -NPs/CPE en medio básico.....	73
Ecuación 15. Modelo polinomial Box-Behnken para la optimización de las variables DPV usando Fe_2O_3 -NPs/CPE en solución de glucosa (0.1 mM).....	77
Ecuación 16. Modelo polinomial Box-Behnken para la optimización de las variables DPV usando MOF MIL-100 Mn/CPE en solución de glucosa (1 μM).	87
Ecuación 17. Mecanismo de oxidación electroquímica no enzimática de ácido úrico.	97
Ecuación 18. Modelo polinomial Box-Behnken para la optimización de las variables DPV usando Bi_2O_3 -NPs/CPE en solución de ácido úrico (0.5 mM).....	98

Índice de abreviaturas

A	Paso de potencial
Å	Armstrong
4-AAP	4-aminoantipirina
4-AF	4-aminofenazona
AA	Ácido ascórbico
ABS	Solución buffer de acetato
adj-R ²	Coefficiente de determinación ajustado
AO	Ácido oxálico
AU	Ácido úrico
β	Coefficiente de las variables en el DBB
B	Ancho de pulso
b	intercepto de la recta
BRB	Solución buffer Britton-Robinson
C	Período de pulso
CA	Cronoamperometría
CNTs	nanotubos de carbono
CPE	Electrodo de pasta de carbono
CS	Quitosano
CV	Voltamperometría cíclica
D	Amplitud de pulso
1-D	Unidimensional
2-D	Bidimensional
3-D	Tridimensional
DBB	Diseño de experimentos Box-Behnken
DCPS	2-4 diclorofenol sulfonato
DPV	Voltamperometría diferencial de pulso
DoE	Diseño de experimentos
e ⁻	Electrón
E	Potencial de voltaje

EMC	Error medio cuadrático
E_0	Potencial de voltaje inicial
E_{\max}	Potencial de voltaje máximo
E_{pc}	Potencial de voltaje de pico catódico
E_{pa}	Potencial de voltaje de pico anódico
g	Gramos
GCE	Electrodo de carbono vítreo
Glc	Glucosa
GO	Óxido de grafeno
Gox	Glucosa oxidasa
GS	Grafeno tipo Sandwich
H^+	Protón
h-BN	Nitruro de boro hexagonal
I	Intensidad de corriente
I_{pc}	Intensidad mínima de corriente de pico catódico
I_{pa}	Intensidad máxima de corriente de pico anódico
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
LDA	análisis discriminante lineal
LSV	Voltamperometría lineal de barrido
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
m	Pendiente de la recta
M	Molaridad (molL^{-1})
mg	Miligramos
mM	Milimolar
μM	MicroMolar
mL	Mililitros
MIL	Material del Instituto Lavoisier
MLP	Perceptrón multicapa
MOF	Metal organic-frameworks
ms	Milisegundos

MSE	Promedio de los errores al cuadrado
mV	Milivoltios
mV/s	Milivoltios por segundo
MWCNTs	Nanotubos de carbono multi-paredes
N	Número de muestras
NF	Electrodo níquel Foam
nm	Nanómetro
NPs	Nanopartículas
OFAT	Estrategia de optimización un-factor-por-vez (uni-variable)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PanNTs	Nanotubos polinilina
PBS	Solución buffer de acetato
PCA	Análisis de componentes principales
<i>p</i> -HBA	<i>p</i> -hidroxibenzóico
pH	Potencial de hidrógeno
pKa	Constante de acidez
PLS-DA	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales
POD	Peroxidasa
PPy	Polipirrol
pred-R ²	Coefficiente de determinación predictivo
PR	Porcentaje de recobro en la red neuronal artificial
PTCA	Ácido perilentetracarboxílico
PVA	Alcohol polivinílico
R	Coefficiente de correlación múltiple
R ²	Coefficiente de determinación
rGO	Óxido de grafeno reducido
RNA	Red neuronal artificial
RSD	Desviación estándar relativa
s	Sensibilidad analítica
S _{y/x}	error típico del ajuste en la recta
S	Desviación estándar

SPE	Electrodo serigrafiado
SWA	Voltamperometría de redisolución anódica
SWV	Voltamperometría de onda cuadra
t	Prueba t-student
T ₀	Tiempo inicial
T ₁	Primer tiempo programado
T ₂	Segundo tiempo programado
T ₃	Tercer tiempo programado
T _f	Tiempo final
UV-Vis	Ultravioleta-visible
V	Voltio
W _j	Pesos sinápticos
x	Variable en el DBB
χ^2	Estadístico Chi-cuadrado
x _n	Datos de entrada en la red neuronal artificial
Y _i	Valor obtenido en la red neuronal artificial
y _i	Valor esperado
ZIF	Zeolite Imidazol Frameworks

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

1.1 La importancia del monitoreo clínico de la glucosa y ácido úrico.

El monitoreo de la concentración de glucosa (Glc) y ácido úrico (AU) en los fluidos fisiológicos tiene importancia clínica, debido a la prevención y control de los padecimientos relacionados con niveles anormal en la concentración de Glc y AU en el organismo, por ejemplo, enfermedades como, la diabetes y gota, respectivamente.

Las cifras de la Federación Internacional de la Diabetes indican que en el año 2021 en el mundo se estima que 537 millones de personas fueron diagnosticadas con diabetes, y desafortunadamente en México se reportó la existencia de 14.1 millones de enfermos diabéticos.^{1,2} Desafortunadamente, se pronostica que para el 2030 la diabetes será la séptima causa de muerte en la población humana.³

Las cifras relacionadas con la enfermedad de la gota también son alarmantes, de acuerdo con la Organización Internacional de la Salud (OMS) en el año 2020 se registraron 41.2 millones enfermos de gota en la población mundial,⁴ y en México se estima que el 11% de la población presenta problemas relacionados con niveles anormales de AU en el organismo.⁵

1.1.1 Glucosa.

La Glc (figura 1.1) es un monosacárido con formula química $C_6H_{12}O_6$, considerada como la principal fuente de energía en el organismo humano^{6,7} y se incorpora al torrente sanguíneo a partir del consumo de carbohidratos como los monosacáridos (galactosa y fructuosa), disacáridos (lactosa y sacarosa) o polisacáridos (almidón) y además a través del proceso de gluconeogénesis por la descomposición de grasas y proteínas formando glucógeno que es almacenado en el hígado y músculos esqueléticos para su posterior uso en el requerimiento energético de las células.⁸

La presencia de Glc en la sangre se conoce con el término de glicemia y los niveles normales postprandiales (nivel de Glc medida dos horas después de la comida) se encuentran en el intervalo de concentración de $7800 \mu M - 11000 \mu M$ en sangre,⁹ $2780 \mu M - 5550 \mu M$ orina,¹⁰

230 μM – 380 μM saliva,^{11,12} 60 μM – 110 μM sudor^{12,13} y 50 μM – 500 μM en fluido ocular.¹⁴

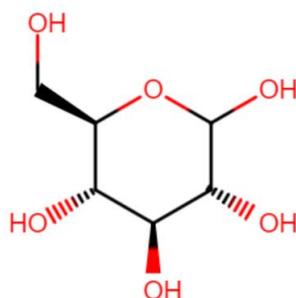


Figura 1.1 Representación de la estructura química de la D-glucosa.

Valores por encima de los normales (hiperglicemia) se relacionan con la enfermedad conocida como diabetes,^{15,16} ocasionando complicaciones crónicas (renales, cardiovasculares, ceguera, amputaciones y la muerte prematura).¹⁷⁻¹⁹ Valores por debajo de los normales (hipoglicemia) ocasionan dolor de cabeza, lentitud, irritabilidad, agresividad, confusión, eventos psicóticos y crisis convulsivas, debido al déficit de Glc en el sistema nervioso.²⁰

1.1.2 Ácido úrico.

El ácido úrico (AU) o 7,9-Dihydro-1H-purine-2,6,8(3H)-trione ($\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$), es un ácido débil (pKa de 5.8) formado como producto final del metabolismo de las purinas por acción de la enzima xantina oxidasa hasta AU en hígado, intestinos delgados y riñones.^{21,22} El AU (figura 1.2) se encuentra en fluidos fisiológicos (saliva, orina y suero sanguíneo)²³ y sus niveles de producción en el organismo dependen del consumo de purinas, alcohol o defectos enzimáticos en el metabolismo de las purinas.²⁴

Los niveles normales de AU en el ser humano (uricemia) se encuentran en el rango de 236.0 μM -420.0 μM en sangre²⁵ y 1400 μM – 4400 μM en orina.²⁶ Estos niveles contribuyen a la salud con acciones antioxidantes, neuroprotectoras e inmunes,²⁷⁻²⁹ niveles bajos (hipouricemia) se relacionan con enfermedades neurológicas³⁰⁻³² y niveles en exceso (hiperuricemia) se relacionan estrechamente con la enfermedad conocida como gota y otras

como la diabetes, hipertensión y problemas cardiovasculares.³³⁻³⁶ El monitoreo de la concentración de AU en fluidos fisiológicos es una medida preventiva para evitar complicaciones relacionadas con niveles anormales de uricemia.

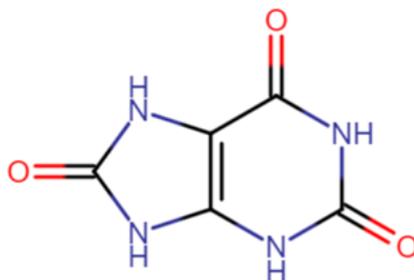


Figura 1.2 Representación de la estructura química del ácido úrico.

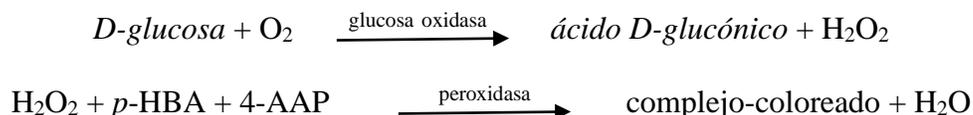
1.2 Técnicas analíticas convencionales para cuantificar glucosa y ácido úrico.

Debido a la importancia de la Glc y AU para el ser humano, los problemas relacionados con valores anormales en el organismo y la consecuente necesidad de monitoreos continuos, la química analítica ha dedicado gran parte de sus esfuerzos al desarrollo de metodologías para la cuantificación de estas moléculas en muestras fisiológicas, y evitar así complicaciones a la salud en la población.

1.2.1 Técnicas analíticas convencionales para cuantificar glucosa.

El método clínico más empleado para la cuantificación de la Glc es la espectrofotometría-enzimática empleando a la enzima glucosa oxidasa (ecuación 1).³⁷

En esta técnica la cuantificación de Glc se hace de manera indirecta mediante dos etapas secuenciales: en una primera etapa la enzima glucosa oxidasa, oxida enzimáticamente a la glucosa en ácido glucónico y se produce peróxido de hidrógeno, y en una segunda etapa la enzima peroxidasa reacciona con el peróxido de hidrógeno, el ácido *p*-hidroxibenzoico (*p*-HBA) y 4-aminoantipirina (4-AAP) produciendo un compuesto coloreado el cual es medido en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 505 nm, la absorbancia registrada es proporcional a la cantidad de Glc en la muestra.³⁸



Ecuación 1. Mecanismo de oxidación enzimática de la glucosa.

Una de las desventajas que presenta el método enzimático, es la presencia de interferentes en el suero sanguíneo o en la orina (bilirrubina, ácido ascórbico y AU) que pueden ser oxidados por el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) producido en la reacción catalizada por la enzima glucosa oxidasa y afectar el resultado.³⁹

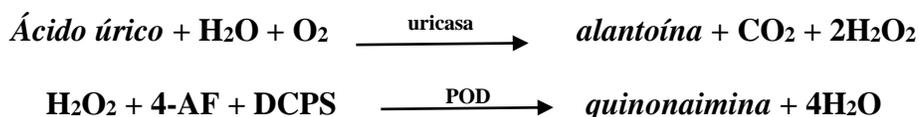
Otro inconveniente de este método es el efecto de la glucólisis que se presenta en el lapso de la toma de muestra y hasta su pretratamiento, debido a que existe un consumo de Glc en sangre *ex vivo*, por el cual los valores de Glc pueden disminuir en promedio entre 5 a 7% por hora.⁴⁰

Otros métodos espectrofotométricos para la determinación de Glc son el de la o-toluidina⁴¹ y ferricianuro.⁴² El método de o-toluidina, presenta varios inconvenientes, por ejemplo, el empleo de ácido acético concentrado para la preparación de reactivos requeridos en el análisis puede ser irritante para los analistas y causar deterioro paulatino en los utensilios del espectrofotómetro, y la presencia de azúcares reductores, varios medicamentos, el AU, la creatinina y la bilirrubina, pueden interferir en los resultados obtenidos.⁴³ Por otro lado, el método de la reducción del ferricianuro es afectado por varias sustancias interferentes, fundamentalmente la creatinina y el AU, observándose valores de Glc falsamente elevados en pacientes con hiperuricemia; a pesar de esto, fue el primer método automatizado para la determinación de Glc.⁴⁴

Otras propuestas recientemente reportadas incluyen el uso de espectrofotometría UV-Vis,⁴⁵⁻⁴⁷ cromatografía de líquidos,⁴⁸⁻⁵⁰ fluorescencia,⁵¹⁻⁵³ electroforesis capilar⁵⁴⁻⁵⁶ o quimioluminiscencia.⁵⁷⁻⁵⁹ Desafortunadamente, estas técnicas presentan varias desventajas, por ejemplo, la necesidad de un pretratamiento previo de la muestra, instrumentación sofisticada y uso de solventes orgánicos.⁶⁰⁻⁶²

1.2.2 Técnicas analíticas convencionales para cuantificar ácido úrico.

En la actualidad, el método de detección más común para AU es la espectrofotometría-enzimática con uso de la enzima uricasa (ecuación 2). En una primera etapa, el AU es oxidado por la enzima uricasa a alantoína y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), posteriormente el H₂O₂ en presencia de peroxidasa (POD) reacciona con el 4-aminofenazona (4-AF) y 2-4 diclorofenol sulfonato (DCPS) formando quinonaimina que es un compuesto rosáceo. Por espectrofotometría se mide la absorbancia a 520 nm la cual es proporcional a la concentración de AU presente en la muestra ensayada.⁶³



Ecuación 2. Mecanismo de oxidación enzimática del ácido úrico.

El método es relativamente fácil de realizar, sin embargo, sus desventajas radican en los cuidados de la enzima (deben de mantenerse en frascos bien cerrados y a una temperatura de 2 a 8 °C, protegidos de la luz para evitar su desnaturalización prematura), y con las muestras de suero o plasma (tienen una estabilidad de 3 a 5 días cuando son refrigeradas de 2 a 8 °C). Otras desventajas que presentan este método son: baja sensibilidad, un proceso complejo de detección, un rango lineal estrecho y un alto costo por el empleo de la enzima.⁶⁴

Otros métodos analíticos reportados recientemente para la detección de AU involucran el uso de espectrofotometría,⁶⁵⁻⁶⁷ cromatografía,⁶⁸⁻⁷¹ electroforesis,⁷²⁻⁷⁴ quimioluminencia⁷⁵⁻⁷⁷ y fluorescencia,⁷⁸⁻⁸⁰ sin embargo, la mayoría de ellos presentan varios inconvenientes, destacando la necesidad de una etapa de pretratamiento de la muestra para evitar interferencias en la señal analítica, alto costo de instrumentación, el uso de solventes orgánicos, personal con capacitación sofisticada, entre otros.⁸¹

1.3 Técnicas electroquímicas para cuantificar biomoléculas.

El término electroanálisis describe al área de la electroquímica que se encarga de relacionar las magnitudes eléctricas en un sistema electroquímico con la concentración de un analito.

Recientemente, se ha reportado en la literatura el desarrollo de metodologías electroanalíticas para cuantificar infinidad de moléculas de interés bioquímico y clínico, como la Glc y AU. Lo anterior es debido a las ventajas que poseen estas técnicas sobre las convencionales, tales como: alta sensibilidad, rápida respuesta y bajo costo de operación, en comparación con las técnicas convencionales.⁸²

En la actualidad existe una gran variedad de técnicas electroquímicas que se han aplicado en el desarrollo de metodologías analíticas, sin embargo, nos enfocaremos en describir a la voltamperometría ya que es la que se desarrolla en el trabajo de investigación de esta tesis.

1.3.1 Voltamperometría.

La voltamperometría es una técnica electroquímica que basa su funcionamiento en la aplicación un potencial eléctrico variable a un electrodo de trabajo sumergido en una solución electrolítica que contiene una especie electroactiva, midiendo la intensidad de corriente que circula en ese electrodo debido a las reacciones redox de las especies electroactivas.⁸³

En la voltamperometría se emplea una celda electroquímica formada por un electrodo de trabajo o sensor electroquímico, un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar, sumergidos en la disolución electrolítica en donde se lleva a cabo la reacción de transferencia de electrones hacia la superficie del electrodo de trabajo (figura 1.3):

- a) Electrodo de referencia. Se incluye en la celda para medir el potencial del electrodo de trabajo a partir del valor constante de potencial que mantiene durante todo el análisis electroquímico. El electrodo de referencia más empleado es el electrodo Ag/AgCl (plata/cloruro de plata) que consta de un cuerpo cilíndrico que contiene un hilo de plata (sumergido en una solución de 3 M KCl) recubierto de AgCl.

- b) Electrodo auxiliar o contraelectrodo. Es el electrodo donde circula toda la corriente eléctrica necesaria para equilibrar el flujo de corriente presente en el electrodo de trabajo. Uno de los más empleados es la barra de grafito debido a su buena conductividad, bajo costo y disponibilidad.
- c) Electrodo de trabajo: es sobre el cual se aplica un potencial para cuantificar al analito. De los materiales más usados para estos electrodos están los carbonáceos, siendo el electrodo de carbón vítreo (GCE) y los electrodos de pasta de carbono (CPE) los más empleados, sin embargo, estos últimos (formados por una mezcla de polvo de grafito y un aglutinante) presentan varias ventajas que los hacen más atractivos para su empleo en el electroanálisis, como son: una simple construcción, bajo costo en su construcción, pueden ser modificados fácilmente mediante la mezcla con otros materiales para mejorar su rendimiento electrocatalítico.

Los tres electrodos son conectados externamente a un potenciostato, y cada uno de ellos juega un papel importante para el electroanálisis.⁸⁴

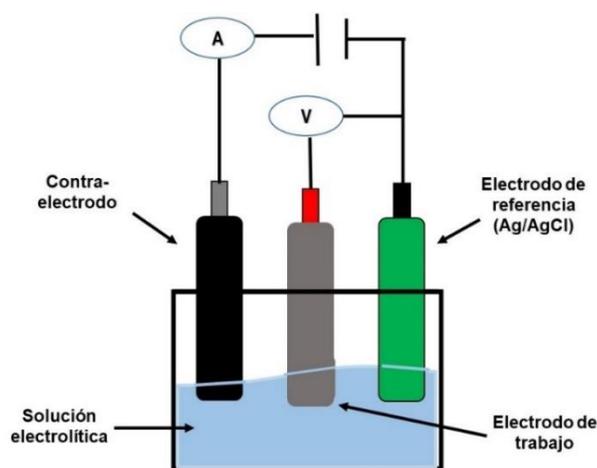


Figura 1.3 Representación de un sistema de tres electrodos.

El sistema de tres electrodos permite medir la intensidad de corriente registrada durante el análisis electroquímico, que es representada en un diagrama de corriente-voltaje denominado voltamperograma (figura 1.4), y que se construye graficando la intensidad de corriente (I) en el eje vertical (y) y el potencial de voltaje (E) en el eje horizontal (x).

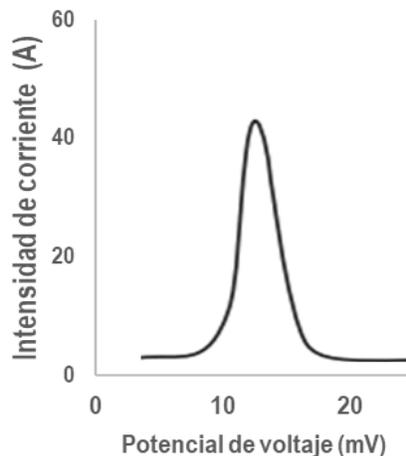


Figura 1.4 Representación de un voltamperograma.

1.3.1.1 Voltamperometría de barrido lineal.

La voltamperometría lineal de barrido o LSV (linear sweep voltammetry) es una técnica electroquímica que es programada para imponer un potencial de voltaje aplicado linealmente desde un potencial de voltaje inicial (E_0) hasta un potencial de voltaje máximo (E_{\max}) en un tiempo determinado que contempla un tiempo inicial (T_0) hasta un valor final (T_f) (figura 1.5).⁸⁵

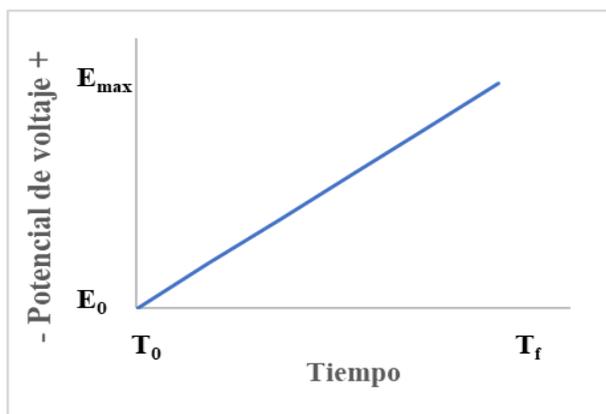


Figura 1.5 Programa de barrido de potencial positivo en voltamperometría lineal. Potencial de voltaje inicial (E_0), potencial de voltaje final (E_{\max}), tiempo inicial (T_0), tiempo final (T_f).

En la figura 1.6, se representa un voltamperograma obtenido mediante barrido lineal, en el cual se puede observar la variación de intensidad de corriente respecto al potencial aplicado. En el diagrama es de interés el valor de la intensidad máxima de corriente de pico anódico

(I_{pa}) y el valor de voltaje de pico anódico (E_{pa}) para una reacción electrofítica en el proceso de oxidación de un analito.

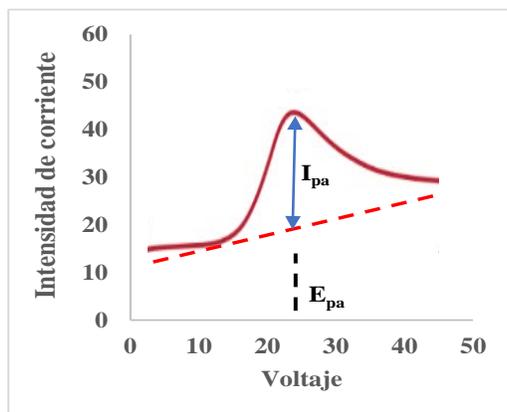


Figura 1.6 Gráfico obtenido mediante voltamperometría de barrido lineal. Voltaje anódico (E_{pa}), intensidad máxima de corriente de pico anódico (I_{pa})

1.3.2 Voltamperometría cíclica.

La voltamperometría cíclica o CV (cyclic voltammetry) es empleada en el estudio cualitativo y cuantitativo de reacciones electroquímicas y su programación se realiza mediante una variación de potencial en forma triangular, es decir el potencial se varia linealmente desde un potencial inicial (E_0) y un tiempo inicial (T_0) hasta un potencial máximo (E_{max}) alcanzado en el primer tiempo programado (T_1) y luego el sentido de barrido se invierte hasta un potencial mínimo (E_{min}) en el segundo tiempo programado (T_2) y posteriormente llega al potencial inicial (E_0) en el tiempo tres o final (T_3) originando un ciclo entre potenciales (figura 1.7).⁸⁶

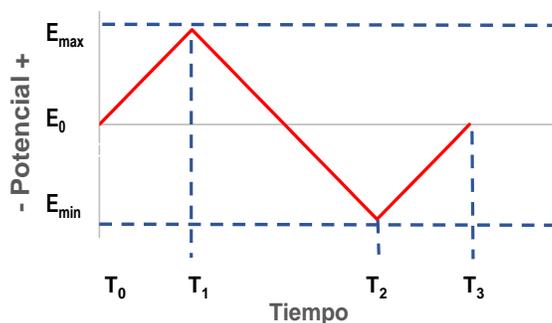


Figura 1.7 Programa de potencial en voltamperometría cíclica.

Potencial de voltaje inicial (E_0), potencial de voltaje máximo (E_{max}), potencial de voltaje mínimo (E_{min}), tiempo inicial (T_0), primer tiempo programado (T_1), segundo tiempo programado (T_2), tercer tiempo programado (T_3).

En un voltamperograma cíclico (figura 1.8) es de interés el potencial de pico anódico (E_{pa}), el potencial de pico catódico (E_{pc}), la intensidad máxima de corriente del pico anódico (I_{pa}) y la intensidad mínima de corriente de pico catódico (I_{pc}), que nos proporcionan información del comportamiento electroquímico de la especie química analizada, además de que la magnitud de la intensidad de corriente de los picos anódico-catódico se relaciona directamente con la concentración de la especie electroactiva presente en la solución electrolítica.⁸⁷

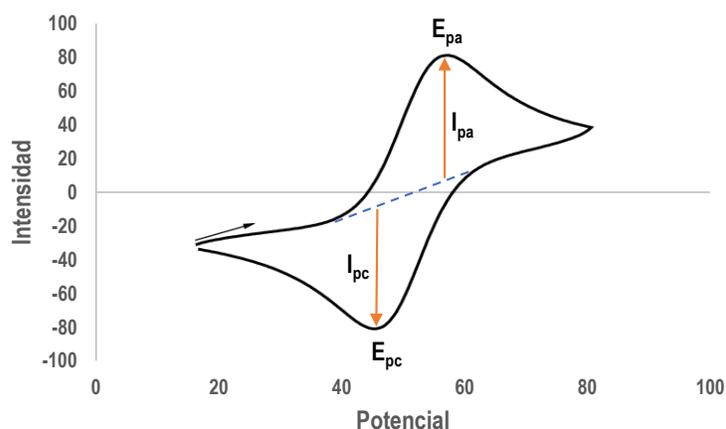


Figura 1.8 Gráfico obtenido mediante voltamperometría cíclica. Intensidad máxima de corriente del pico anódico (I_{pa}), Intensidad mínima de corriente catódica (I_{pc}), potencial de pico anódico (E_{pa}), potencial de pico catódico (E_{pc}).

1.3.3 Voltamperometría diferencial de pulso.

Voltamperometría diferencial de pulso o DPV (differential pulse voltammetry) es una de las técnicas más empleadas en el desarrollo de metodologías analíticas para cuantificar Glc y AU, debido a su alta sensibilidad analítica y bajos límites de detección.⁸⁸

En las mediciones usando DPV, se aplican pequeños impulsos de amplitud en una rampa lineal, y la corriente se mide antes de la aplicación del pulso (T_1) y al final de cada pulso (T_2), se calcula la diferencia entre las corrientes para eliminar la corriente de fondo y obtener una señal de respuesta libre de corriente no faradaica o capacitiva.⁸⁹

En la figura 1.9, observamos que en DPV se encuentran relacionadas cuatro variables con respecto a la señal de respuesta: amplitud de pulso, ancho de pulso, periodo de pulso y paso de potencial.

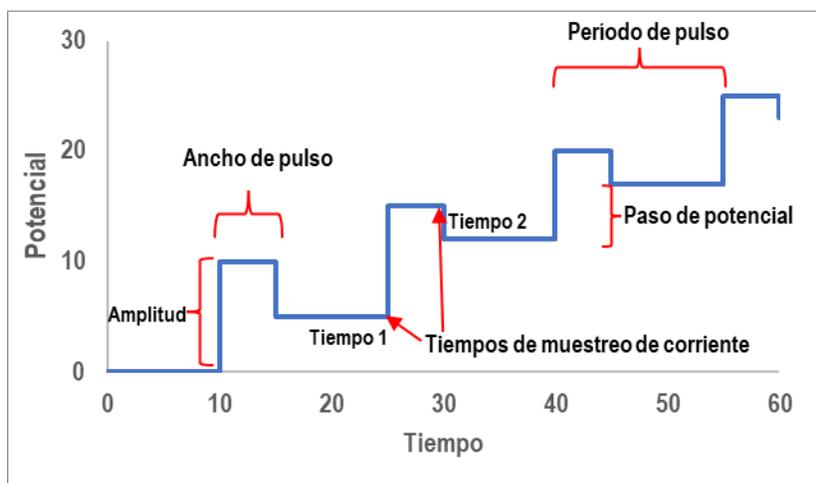


Figura 1.9 Programa de potencial en voltamperometría diferencial de pulso.

La principal ventaja de DPV es la baja corriente capacitiva, lo que mejora las características analíticas de la técnica, por lo que se emplea ampliamente en análisis cuantitativos. En la figura 1.10, se representa un voltamperograma típico obtenido mediante DPV para la oxidación de un analito proceso relacionada a la intensidad de corriente anódica (I_{pa}) generada a un potencial anódico de trabajo (E_{pa}).

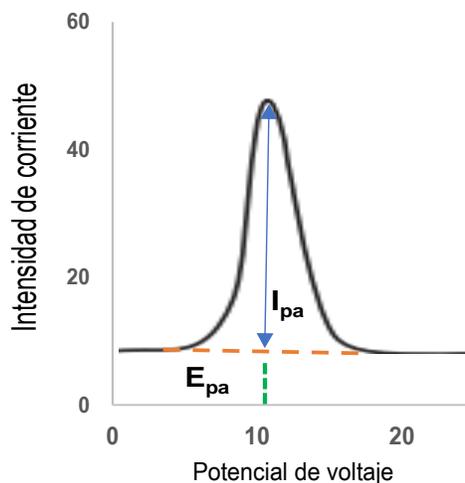


Figura 1.10 Gráfico obtenido mediante voltamperometría diferencial de pulso. Intensidad máxima de corriente del pico anódico (I_{pa}), potencial de pico anódico (E_{pa})

Recientemente, varios grupos de trabajo han optado por la implementación de metodologías basadas en DPV para la determinación de biomoléculas en muestras fisiológica empleando sensores electroquímicos modificados con nanopartículas de óxidos metálicos o metal organic-frameworks (MOF).^{90,91}

1.3.4 Sensores electroquímicos para la determinación de glucosa y ácido úrico

Un sensor electroquímico, es el dispositivo capaz de detectar y/o cuantificar especies electroactivas y traducir la información de una especie electroactiva en una señal analítica.^{92,93}

Para su funcionamiento, el sensor electroquímico (figura 1.11) está constituido por dos componentes básicos: receptor (elemento con capacidad de interactuar o reconocer selectivamente a la especie electroactiva presente en la muestra) y transductor (capaz de convertir la señal de respuesta del receptor en una señal procesable, por ejemplo, señal electroquímica).⁹⁵

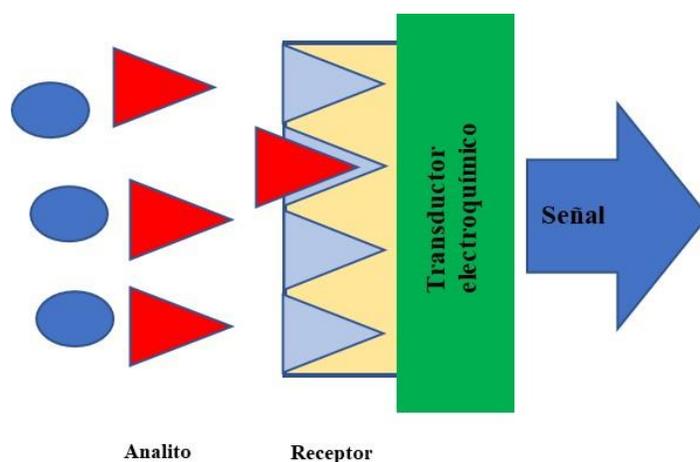


Figura 1.11 Representación de elementos en un sensor electroquímico.

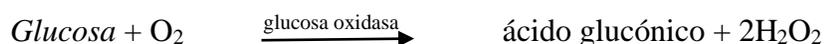
Actualmente, las técnicas electroquímicas y el uso de sensores electroquímicos constituyen una alternativa en desarrollo para cuantificar Glc o AU en muestras fisiológicas, debido a sus ventajas (bajo costo, construcción simple, operatividad sencilla, alta sensibilidad, selectividad analítica y obtención de información analítica en tiempo real).^{96,97}

Los sensores electroquímicos usados en la cuantificación de Glc y AU pueden ser clasificados en enzimático o no enzimáticos.

Debido a las diversas complicaciones relacionadas con niveles anormales de Glc y AU en el organismo humano, se ha reportado en la literatura el desarrollo de sensores electroquímicos enzimáticos para cuantificar la glicemia y uricemia.

Los sensores electroquímicos enzimáticos para Glc y AU son dispositivos que aprovechan las ventajas de los métodos electroquímicos y la inmovilización de una enzima.⁹⁸

Para el caso de la Glc, el primer sensor electroquímico enzimático para Glc fue desarrollado Clark y Lyons en el Hospital Infantil de Cincinnati en el año de 1962, y la cuantificación enzimática de la Glc se realizó mediante el monitoreo del oxígeno, de acuerdo con el mecanismo representado en la ecuación 3.⁹⁹



Ecuación 3 Mecanismo de oxidación enzimática de glucosa en sensor electroquímico.

Para la cuantificación del AU, uno de los primeros sensores enzimáticos reportado fue construido por Nanjo & Guilbault en el año de 1974⁹⁹ para su aplicación en muestras de sangre y orina. Los sensores enzimáticos para AU basan su funcionamiento en la medición del consumo de oxígeno durante la reacción catalizada por la enzima uricasa, de acuerdo con el mecanismo representado en la reacción 4.¹⁰⁰



Ecuación 4. Mecanismo de oxidación enzimática de ácido úrico en sensores electroquímicos.

A pesar de las limitaciones presentadas por los sensores enzimáticos (por ejemplo, el ruido ocasionado por el oxígeno de fondo en la reacción y la vulnerabilidad de la enzima a cambios ambientales), su creación impulsó el desarrollo de nuevas propuestas de manera

exponencialmente y ha permitido que en la actualidad se dispongan de sensores portátiles para ser empleados en el monitoreo continuo de la glicemia y uricemia:

- a) Para medir los niveles de glicemia, se emplean los glucómetros portátiles que son los dispositivos más empleados en la cuantificación de los niveles de Glc en la población. Estos equipos constan de sensores enzimáticos (tiras reactivas impregnadas con la enzima glucosa oxidasa) y un dispositivo amperométrico portátil (glucómetro) que permite la cuantificación de la glicemia. Para cuantificar los niveles de glicemia con las tiras reactivas, se debe impregnar con una gota de sangre y posteriormente introducirse en el glucómetro para la medición (figura 1.12).¹⁰¹
- b) En el caso de la medición de uricemia recientemente, se inició la comercialización de un dispositivo portátil (Sinocare) que permite la cuantificación de AU en muestras de sangre empleando tiras reactivas impregnadas con enzimas uricasa (figura 1.16) y un funcionamiento similar al del glucómetro.

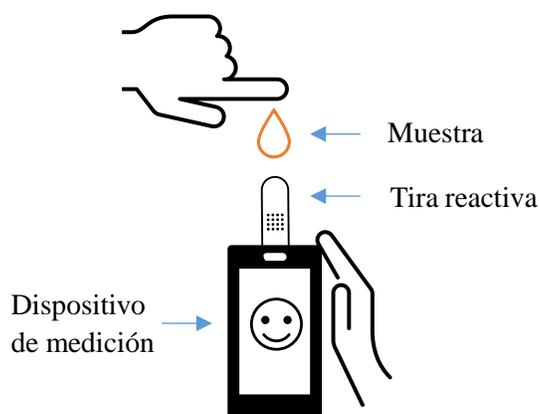


Figura 1.12 Medición de glicemia empleando un glucómetro comercial.

Sin embargo, estos equipos presentan problemas y errores debidos a diferentes factores entre los que se destacan: pilas bajas o tiras caducadas, glucómetro sucio o descompuesto, mala calibración del glucómetro, exposición de las tiras reactivas a factores ambientales (humedad, temperatura, etcétera) que afecten la estabilidad de la enzima, entre otros.¹⁰²

Además, los procedimientos complejos de purificación de enzimas, altos costos de producción, falta de estabilidad a largo plazo (desnaturalización de la enzima) son otras desventajas de los sensores enzimáticos.^{103,104}

Debido a las limitaciones que presentan las tiras enzimáticas, además de todas las técnicas de análisis basadas en enzimas, diversos grupos de trabajo se han sumado a la tendencia de sustituir a las enzimas por materiales económicos y estables.

1.4 Materiales inertes empleados en la modificación de sensores electroquímicos.

El empleo de nanoestructuras metálicas y MOF han permitido el desarrollo y la construcción de nuevas propuestas de sensores electroquímicos para cuantificar Glc¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ y AU^{108,109} en muestras fisiológicas.

Debido a la importancia que han adquirido estos materiales en los últimos años en el desarrollo de sensores electroquímicos libres de enzima, realizaremos una descripción breve de estos materiales.

1.4.1 Nanopartículas metálicas.

Las nanopartículas metálicas (diámetro promedio de 1 nm a 100 nm)¹¹⁰ han despertado un gran interés en el desarrollo de sensores electroquímicos para cuantificar diversas biomoléculas, fármacos, contaminantes, etcétera, debido a sus dimensiones nanométricas que incrementan el número de átomos por unidad de área (aumentando la reactividad del material).¹¹¹⁻¹¹² Estas propiedades superiores permiten que las nanoestructuras metálicas se apliquen en la detección de biomoléculas, como la Glc o AU.

Las nanoestructuras de metales de transición nobles (oro, plata y platino)¹¹³⁻¹¹⁵ han sido los materiales más empleados para el desarrollo de sensores no enzimáticos para cuantificar Glc y AU, debido a sus superiores propiedades electrocatalíticas.¹¹⁶

Desafortunadamente, los materiales nobles y sus nanoestructuras son costosos y escasos, características que incrementaría el costo de análisis clínico mediante el uso de sensores no enzimáticos basados en ellos.^{117,118} Es por esto que en los últimos años las investigaciones se han orientado en la sustitución de los materiales preciosos por el uso de nanoestructuras de óxidos metálicos,^{119,120} que han demostrado propiedades electrocatalíticas para mejorar la oxidación de biomoléculas y, además, son materiales económicos y accesibles.¹²¹⁻¹²³

1.4.2 Nanoestructuras de óxidos metálicos.

Las nanoestructuras de óxidos metálicos representan una excelente alternativa para remplazar a las enzimas y a los metales nobles en los sensores electroquímicos empleados para la cuantificación de biomoléculas de interés clínico como la Glc y AU debido a su bajo costo, abundancia, estabilidad química, funcionamiento a diferentes pHs de trabajo, gran área electroactiva y buenas propiedades eléctricas.^{124,125} Además, se han reportado rendimientos analíticos comparables al de las nanopartículas de metales nobles para cuantificar biomoléculas en muestras fisiológicas.^{126,127}

En esta tesis se describe el uso de nanopartículas de óxido de hierro (III) y nanopartículas de óxido de bismuto (III) para desarrollar sensores electroquímicos no enzimáticos para Glc y AU, respectivamente; en las siguientes secciones se describirán sus características y ventajas sobre otras estructuras.

1.4.3 Nanoestructuras de óxido de hierro (III).

El trióxido de dihierro u óxido férrico, es un material inorgánico presente en la naturaleza en forma de hematita, que se emplea como pigmento en diversas áreas (pintura, cerámica, papel, cemento, vidrio, farmacéutica, alimentaria, etcétera).^{128,129}

Las nanopartículas de óxido de hierro (Fe_2O_3) son estructuras metálicas de bajo costo, alto rendimiento catalítico, alta conductividad, abundancia, estabilidad química y pueden incorporarse fácilmente en la superficie de electrodos de trabajo mejorando su rendimiento electrocatalítico para cuantificar biomoléculas.^{130,131}

Estas propiedades han impulsado el uso de las nanopartículas de Fe_2O_3 en la modificación de sensores electroquímicos para la detección y cuantificación de diversos analitos como dopamina¹³² y colesterol¹³³ evitando el uso de enzimas y las limitaciones de las dificultades de las técnicas como la espectrofotometría, cromatografía, etcétera (pretratamiento de la muestra, instrumentación de alto costo y el empleo de solventes orgánicos)^{134,135}

Es por lo anterior que el uso de nanopartículas de Fe_2O_3 representa una alternativa novedosa y viable para sustituir a las enzimas en los sensores electroquímicos, por lo que en este trabajo se desarrollan sensores no enzimáticos para la determinación de Glc.

1.4.4 Nanoestructuras de óxido de bismuto (III).

El trióxido de dibismuto o bismita, es el compuesto del bismuto más empleado e importante en el sector industrial, siendo sus principales aplicaciones en la industria de la cerámica, medicina y fabricación de vidrios.¹³⁶⁻¹³⁸

Por otro lado, las nanoestructuras de trióxido de dibismuto o bismita (Bi_2O_3), han demostrado poseer propiedades interesantes para su aplicación en el campo de los sensores electroquímicos, como gran área superficial, conductividad eléctrica, bajo costo, abundancia y facilidad para ser incorporadas en la superficie de sensores electroquímicos. A pesar de sus ventajas, han sido poco empleadas en sensores electroquímicos aplicados a la detección de biomoléculas de interés clínico (paracetamol y H_2O_2).¹³⁹⁻¹⁴¹

En esta investigación presentamos el empleo de nanopartículas de óxido de bismuto para la construcción de un novedoso sensor no enzimático para la detección de AU; en la literatura consultada no se encontró evidencia del uso de este material para la cuantificación de AU.

1.4.5 Estructuras metal-orgánicas.

Las estructuras metal-orgánicas o MOF (Metal-Organic Framework), son materiales cristalinos covalentes formados por un centro metálico y un ligante orgánico., que poseen

vacíos interconectados a escala nanométrica que le confieren un potencial para atrapar, almacenar o catalizar biomoléculas.¹⁴²⁻¹⁴⁵

Se han reportado varias técnicas para la síntesis de MOFs: sonoquímico, electroquímico, etcétera, sin embargo, la más reportada es la solvotérmica, debido a su bajo costo y simplicidad; consiste en calentar de forma homogénea un metal de transición (formador de nodos) y un ligante orgánico (con carga negativa) para la formación del MOF.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ El ligante orgánico actúa como un puente que une a los nodos metálicos, formando estructuras unidimensionales (1-D), bidimensionales (2-D) o tridimensionales (3-D) (figura 1.13).¹⁴⁹⁻¹⁵¹

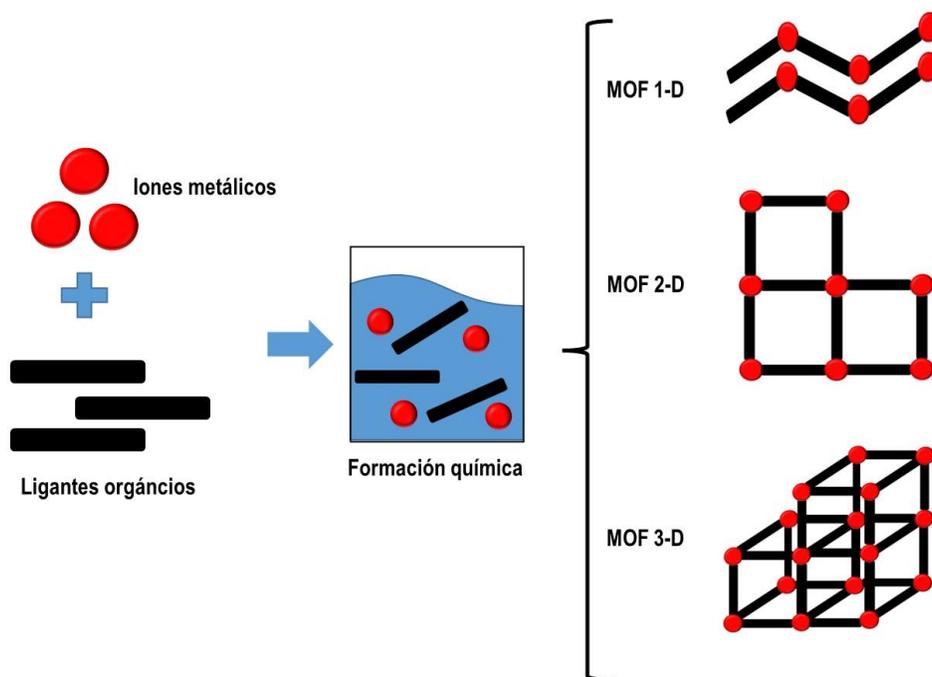


Figura 1.13 Representación de estructuras MOF 1D, 2D y 3D.

Estos materiales tienen características notables, como una alta área superficial y poros sintonizables, que incrementa significativamente el área electroactiva al ser usados como parte de sensores electroquímicos, y la capacidad de adsorción selectiva del analito. Es por esta razón que los MOFs han atraído atención para el desarrollo de sensores no enzimáticos.¹⁵²⁻¹⁵⁴

En esta investigación, se reporta por primera vez el uso del MOF MIL-100 Manganeso (MOF Materials of Institute Lavoisier (MIL)^{155,156} -100 Mn) para la construcción de un sensor no enzimático para la detección de Glc. Cabe mencionar que en la literatura no se encontró evidencia del uso de este material para la construcción de sensores no enzimáticos para la cuantificación de biomoléculas de interés clínico.

1.4.5.1 MOF MIL-100 Mn

Los MOF-MIL son estructuras formadas por centros metálicos trivalentes unidos por ligantes orgánicos, altamente porosos y de gran área superficial. Los metales Al^{3+} y Fe^{3+} , son los centros metálicos más reportados para la formación de MOF MIL-100.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹

Recientemente, se reportó la síntesis del MOF MIL-100 empleando como centro metálico al Mn^{3+} e iones carboxilatos como ligantes. La estructura sintetizada presentó forma octaédrica (nodos metálicos en las esquinas conectados por el ligante orgánico) unidas en una red organometálica con poros de 25 Å y 29 Å (figura 1.14).¹⁶⁰⁻¹⁶²

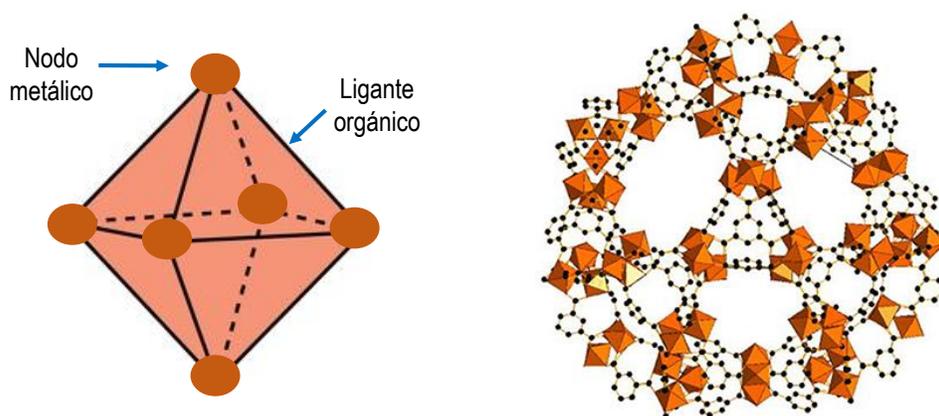


Figura 1.14 Representación de estructuras MOF MIL-100 Mn.

De acuerdo, con varios reportes las aplicaciones de MOF MIL-100 Mn son pocas y recientes, entre las que se destacan oxidación de especies químicas (monóxido de carbono,¹⁶³ alquenos¹⁶⁴ y tolueno¹⁶⁵), reducción de nitrofenol,¹⁶⁶ combustión catalítica del clorobenceno,¹⁶⁷ materiales anódicos en baterías de litio¹⁶⁸ y como materiales supercapacitores.¹⁶⁹

Desafortunadamente y como se mencionó antes, el MOF-MIL-100 Mn no se ha empleado en el desarrollo de sensores electroquímicos para la cuantificación de especies químicas.

1.5 Sensores electroquímicos no enzimáticos para la determinación de glucosa y ácido úrico

La incorporación de nanopartículas de óxidos metálicos o MOF en la construcción de sensores no enzimáticos apertura una gran área de oportunidad y posibilidades para el desarrollo de nuevos sensores de trabajo.^{170,171}

El desarrollo de sensores electroquímicos no enzimáticos para cuantificar Glc y AU adquirió un gran interés en la comunidad científica en los últimos años, debido a los diversos problemas de salud relacionados con niveles anormales de glicemia y uricemia, aunado a las desventajas de los sensores enzimáticos propiciadas por las limitaciones de las enzimas.

Para la Glc (tabla 1.1) y AU (tabla 1.2), se han reportado sensores electroquímicos no enzimáticos modificados con materiales inertes como nanopartículas metálicas nobles, nanoestructuras de óxidos metálicos y recientemente las estructuras denominadas MOF.

Tabla 1.1 Sensores no enzimáticos modificados con nanopartículas de óxidos metálicos o MOF para cuantificar glucosa

Sensor	Técnica	Medio	Potencial de trabajo (mV)	LOD μM	Rango lineal μM	Referencia
PPy-AgNPs/GCE	CA	0.1 M NaOH	900	3.6	25 – 2500	172
Cu ₂ O nanocubos/SPE	CA	0.1 M KOH	700	3.1	7-4500	173
NiO/GO/GCE	CA	0.10 M NaOH	600	0.77	2-600	174
Co ₃ O ₄ nano-láminas/GCE	CA	0.10 M NaOH	600	1-50	15-3000	175
Ni MIL-77/GCE	CA	0.10 M NaOH	600	0.25	1-500	176
GS@ZIF-67/GCE	CA	0.10 M NaOH	600	0.36	1–805.5	177
3D Cu-MOF/CNTs/GCE	CA	0.1 M NaOH	310	0.017	0.02-80	178

Cronoamperometría (CA), polipirrol (PPy), nanopartículas (NPs), óxido de grafeno (GO), material del Instituto Lavoisier (MIL), grafeno tipo Sandwich (GS), Zeolite Imidazol Frameworks (ZIF), nanotubos de carbono (CNTs), solución buffer de acetato (PBS), metal organic-frameworks (MOF), electrodo de carbono vitreo (GCE), electrodo serigrafiado (SPE), molaridad (M, molL⁻¹).

Estos materiales, se incorporan a los electrodos de trabajo para incrementar su área electroactiva, y mejorar la transferencia de electrones en el proceso de oxidación de la Glc.

Tabla 1.2 Sensores no enzimáticos modificados con nanopartículas de óxidos metálicos o MOF para cuantificar AU

Sensor	Técnica	Medio	Potencial de trabajo (mV)	LOD μM	Rango lineal μM	Referencia
AgNPs/rGO/GCE	LSV	0.1 M PBS	610	8.2	10-1000	181
CuO nano-rice/GCE	CA	0.1 M PBS	400	0.83	0.83–253	182
ZnO-NPs/GCE	SWA	0.1 M PBS	400	0.11	0.2–150	183
nanoSnO ₂ /MWCNT/CPE	DPV	0.1 M PBS	422	1	3–200	184
ZIF-11/GCE	--	0.1 M BRB	280	0.48	50–540	185
GO-ZIF67/GCE	DPV	0.1 M PBS	250	0.1	0.8 – 200	186
ZIF-67/g-C ₃ N ₄ /GCE	DPV	0.1 M PBS	280	0.052	0.2–6.5	187

Voltamperometría de barrido lineal (LSV), voltamperometría de redisolución anódica (SWA), voltamperometría diferencial de pulso (DPV), Cronoamperometría (CA), nanopartículas (NPs), óxido de grafeno (GO), óxido de grafeno reducido (rGO), nanotubos de carbono (CNTs), nanotubos de carbono múltipared (MWCNTs), Zeolita Imidazol Frameworks (ZIF), nitruro de carbono grafítico (g-C₃N₄), solución buffer de acetato (PBS), solución buffer Britton-Robinson (BRB), electrodo de carbono vitreo (GCE), electrodo de pasta de carbono (CPE), molaridad (M, molL⁻¹).

El mecanismo de oxidación electroquímica de la glucosa empleando nanopartículas de óxidos metálicos o MOF, es presentando en la figura 1.15 en donde el metal (M) se oxida en la superficie del electrodo de trabajo debido al potencial anódico y pH de la solución electrolítica impuestos, posteriormente la especie metálica oxidada (M^{*}) interactúa con la glucosa propiciando su oxidación a gluconolactona y la reducción de M^{*} a M.^{179,180}

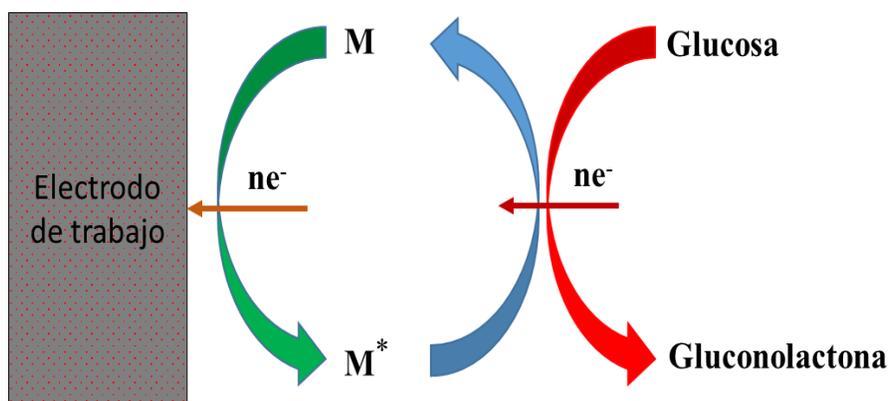


Figura 1.15 Oxidación no enzimática de la glucosa en medio básico

Los autores describen la oxidación electroquímica no enzimática del AU empleando materiales modificantes basados en metales de transición de acuerdo con el siguiente mecanismo (ecuación 5):



Ecuación 5. Mecanismo de oxidación no enzimática de ácido úrico en sensor electroquímico.

Es claro que la modificación de los sensores electroquímicos con nanopartículas de óxidos metálicos o MOFs ha permitido el desarrollo de metodologías electro-analíticas exactas y precisas para la cuantificación de Glc y AU.

Desafortunadamente, algunas propuestas reportan parámetros analíticos poco competitivos, (debido a su rango de trabajo lineal corto).^{174,178, 183, 185}

Por lo tanto, es necesario emplear el Diseño de Experimentos (DoE) para optimizar los parámetros relacionados con la técnica de análisis e incrementar la señal de respuesta del sensor no enzimático.

1.6 Diseño de Experimentos

Antes de la aparición del DoE, los factores o variables de los experimentos se optimizaban usando la estrategia un-factor-por-vez (OFAT).^{189,190} La optimización univariable, consiste en la modificación por separado de cada factor y evaluar la respuesta en cada una de las pruebas. Desafortunadamente, esta estrategia es poco eficiente.^{191,192}

En 1920, Sir Ronald Fisher aplicó por primera vez el DoE para la optimización de producción de papa.^{193,194} Los DoE son herramientas estadísticas aplicadas en tareas de planificación, realización, análisis e interpretación de experimentos mediante la aplicación de pruebas controladas para evaluar el efecto de los factores a diferentes niveles y evaluar su impacto en la señal de respuesta.^{195,196}

En este trabajo de investigación se aplicó el diseño de Experimentos basado en la técnica Box-Behnken para la optimización de las variables implicadas en la técnica analítica DPV y maximizar la señal de respuesta anódica en la oxidación electroquímica de Glc y AU.

1.6.1 Diseño de Experimentos Box-Behnken.

El diseño de experimentos Box-Behnken (DBB) fue desarrollado por George Edward Pelham Box y Donald Behnken para la estimación de los parámetros en un modelo de segundo orden empleando factores con dos o tres niveles para ajustar superficies de respuesta.^{197,198} El DBB consiste en la combinación de diseños factoriales con diseño de bloques incompletos para optimizar las condiciones óptimas para una variable de respuesta (figura 1.16).¹⁹⁹

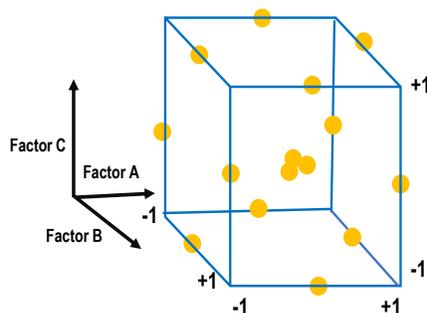


Figura 1.16 Representación de un diseño Box-Behnken para tres factores.

El DBB permite la estimación de los coeficientes de primer y segundo orden, que son expresados en un modelo polinomial (ecuación 6), donde y es la señal de respuesta, β son los coeficientes y los términos x representan las variables.²⁰⁰⁻²⁰²

$$y = \beta_0 + \sum \beta_1 + \sum * \sum \beta_{1j} x_1 x_2$$

Ecuación 6. Representación del modelo polinomial obtenido en el diseño Box-Behnken.

La implementación de DBB generalmente implica cuatro etapas principales:²⁰³

- a) Se establecen el plan experimental a partir de los factores y sus valores iniciales.
- b) Ejecución del plan experimental.

- c) Estimación de los coeficientes del modelo matemático y la comprobación de la precisión del modelo matemático.
- d) Predicción de las condiciones optimizadas para los factores y su confirmación experimental.

Recientemente el DBB se emplea para optimizar los parámetros operacionales de la DPV (amplitud de pulso, ancho de pulso, periodo de pulso y paso de potencial) mediante un modelo que describe el efecto de cada factor y de las interacciones. La precisión del modelo matemático se realiza por la evaluación de su ajuste con los datos experimentales empleando los siguientes parámetros estadísticos (tabla 1.3).²⁰⁴

Tabla 1.3 Parámetros estadísticos para evaluación del modelo en el diseño Box-Behnken

Parámetro	Descripción
Error estándar del ruido (S)	Representa la magnitud de la variación de la respuesta causada por el ruido. Los valores más bajos indican un mejor ajuste.; valores bajos indican que el modelo presenta una mejor respuesta.
Coefficiente de determinación (R ²)	Es el porcentaje de variación en la respuesta que es explicada por el modelo; valores cercanos al 100% indican un mejor ajuste del modelo a los datos experimentales.
Coefficiente de determinación ajustado (adj-R ²)	Es el porcentaje de variación en la respuesta que es explicada por el modelo ajustado por el número de predictores relacionado con el número de observaciones. Su valor se calcula como 1 menos la relación cuadrática medio (MSE) y el total cuadrático medio (MS total). Valores altos indican un buen ajuste.
Coefficiente de determinación predictivo (pred-R ²)	Es el porcentaje de predicción por parte del modelo para nuevas observaciones experimentales. Sus valores oscilan entre 0% a 100% (valores altos indican una mayor precisión en las predicciones del modelo).
Prueba de falta de ajuste (Lack-of-Fit)	Esta prueba exhibe la falta de ajuste adecuado entre los factores experimentales y la variable de respuesta. Para la determinación del ajuste adecuado del modelo se compara el valor de probabilidad del error (p) con el nivel de significación ($\alpha=0.05$), y se establece que no hay evidencia de un ajuste inadecuado del modelo a los datos cuando $p > \alpha$.

La optimización de DPV permite maximizar la señal de intensidad de corriente en el proceso de oxidación-reducción de especie electroactivas sobre la superficie del electrodo de trabajo o sensor electroquímico.^{205,206}

1.6.2 Redes neuronales artificiales.

En ocasiones los sensores electroquímicos no enzimáticos presentan problemas de selectividad en muestras fisiológicas o complejas, debido a la presencia de interferentes que presentan actividad electroquímica, ocasionando respuestas anódicas similares y señales superpuestas, dificultando la cuantificación del analito de interés.²⁰⁷

Para el análisis cuantitativo de mezclas complejas con señales superpuestas, a veces no es suficiente el analizar un solo punto del voltamperograma sino todos los datos de este, que corresponde a la etapa de obtención de los datos.

Esta etapa de procesamiento se puede realizar empleando herramientas de análisis de datos multivariados que son una buena opción para el tratamiento de datos electroquímicos con señales complejas. En la literatura se reportó el uso de análisis de componentes principales (PCA),²⁰⁸ análisis discriminante lineal (LDA),²⁰⁹ análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA)²¹⁰ y las redes neuronales artificiales (RNA).²¹¹

Sin embargo, la superioridad de RNA sobre las otras estrategias se debe a su rápido aprendizaje, operación simple, facilidad de implementación y su capacidad de resolución de problemas no lineales.²¹²

El funcionamiento y ventajas de las RNAs se han empleado en la resolución de los problemas de selectividad que en ocasiones presentan los sensores electroquímicos en muestras complejas.

El funcionamiento de la RNA se basa en el diseño de una red neuronal biológica, que está formada por un soma, dendritas y axón. Las dendritas se encargan de recibir la información

(capa de entrada) y conducirla al soma, donde es procesada (capa oculta) y posteriormente, transmitida a otras neuronas el axón (capa de salida) mediante el proceso de sinapsis (figura 1.17).²¹³

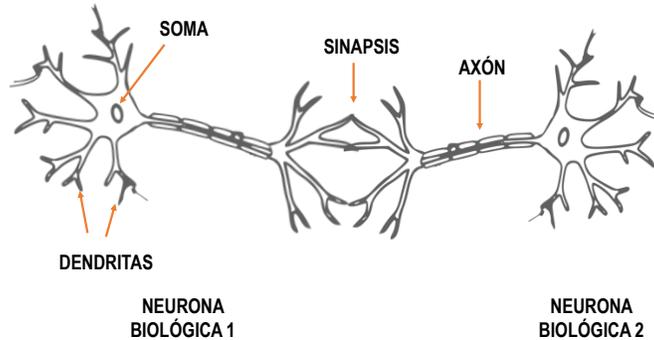


Figura 1.17 Representación de una red neuronal biológica.

En la RNA se emplean unidades simples denominadas neuronas artificiales que se encuentran interconectadas formando una red, imitando al sistema neuronal biológico. En el sistema neuronal artificial, la información se introduce empleando una capa de entrada, posteriormente es procesada en una capa oculta y finalmente es transmitida al exterior mediante una capa de salida (figura 1.18).²¹⁴

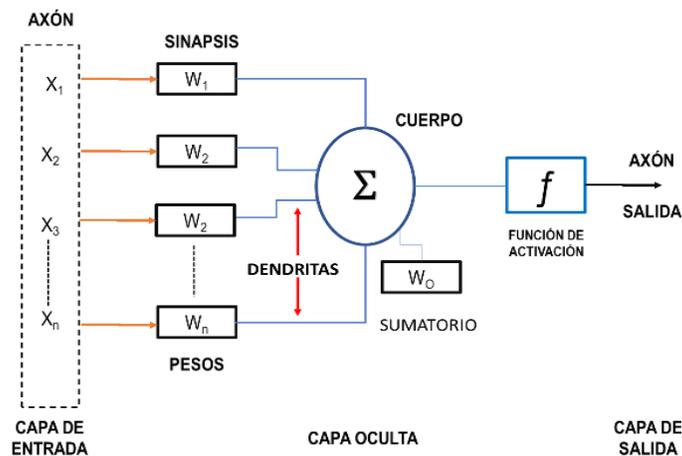


Figura 1.18 Representación de la red neuronal artificial.

Para el buen funcionamiento de la RNA, esta es optimizada en una etapa denominada entrenamiento que consiste en iteraciones para ajustar el número de neuronas, número de capas ocultas, función de transferencia, tasa de aprendizaje y determinar el error de

entrenamiento. La optimización se logra al minimizar error, entre el valor real y el valor obtenido por la RNA.²¹⁵

Debido a sus múltiples ventajas se han desarrollado metodologías basadas en la combinación de DPV y RNA (RNA-DPV) para la cuantificación de analitos presentes en muestras complejas. Por una parte, la voltamperometría permite obtener voltamperograma con suficiente información de los componentes en la mezcla, y RNA permite la interpretación de los datos, facilitando la cuantificación. Se han reportado propuestas para la cuantificación de analitos presentes en mezclas complejas como, dopamina-serotonina,²¹⁶ azúcares,²¹⁷ fármacos,²¹⁸ aminoácidos,²¹⁹ metales,^{220,221} antioxidantes^{222,223} y vitaminas,²²⁴ con excelentes rendimientos.

En este trabajo de investigación, se aprovecharon las ventajas de las RNA para mejorar la cuantificación de AU en presencia de interferentes que ocasionaron señales superpuestas empleando el sensor Bi₂O₃-NPs/CPE.

1.6.3 Perceptrón multicapa.

El perceptrón multicapa (MLP) es el modelo de red neuronal artificial más empleado en el análisis multivariado. Su estructura está formada por una capa de entrada, al menos una capa oculta y una capa de salida, que presentan las siguientes funciones:²²⁵⁻²²⁷

- La capa de entrada en MLP, tiene la función de recibir los datos del problema y el número de neuronas coincide con el valor de descriptores de la muestra seleccionada.
- La capa oculta tiene como objetivo el procesamiento de los datos para la resolución del problema, y el número de neuronas en esta capa debe ser el suficiente para poder resolver satisfactoriamente el problema planteado. No hay una regla general para establecer el número de neuronas en esta capa, aunque debe de evitar un pobre número de neuronas (no se podrá resolver el problema) o una cantidad excesiva de neuronas que ocasionará dos problemas: un sobreajuste de la red resolviendo

inadecuadamente el problema, y un incremento del tiempo de procesamiento de datos hasta convertirlo en un sistema lento e inviable.

- La capa de salida se emplea para proporcionar el resultados o resolución del problema, empleando un número de neuronas que coincide con el número de objetivos a resolver por la MLP.

En el perceptrón multicapa, las neuronas se conectan mediante pesos sinápticos (conexiones variables) que son valores que ajustan los datos de la capa de entrada, propagando las predicciones para cada neurona hasta la capa de salida y propiciando que el perceptrón multicapa emita un resultado. Estos pesos sinápticos, se ajustan continuamente mediante múltiples iteraciones y se culmina hasta que el programa logra la respuesta esperada. A esta etapa, se le conoce como etapa de entrenamiento.^{228,229}

Los elementos necesarios para lograr el entrenamiento de un perceptrón multicapa,²³⁰ son:

- a) Datos de entrada (x_n). Se puede emplear información digital (binaria) o continua (analógica), dependiendo el objetivo planteado en el desarrollo de la MLP.
- b) Pesos sinápticos (w_i). Son valores asociados a los datos de entrada y se emplean para definir la intensidad entre neuronas pre-sinápticas (i) y post-sinápticas (j), además permite ajustar los valores sinápticos para que MLP sea capaz de resolver el problema planteado.
- c) Función de entrada ($y_i = \sum X_i W_{ij}$). Permite obtener la sumatoria de entradas ponderadas, mediante el producto de los valores de entrada y los pesos sinápticos asignados.
- d) Función de transferencia o función de activación ($Y_i(t) = f_i[n_i(t)]$). Es una de las partes más importantes en MLP, y tiene como objetivo simular el funcionamiento de una neurona biológica ante un estímulo en los datos de entrada. En la tabla 1.4, se presentan las funciones de activación que pueden emplearse en el entrenamiento de MLP.²³¹
- e) Función de entrenamiento. Permite generar un vector cuyos componentes serán tratados por la función de activación para determinar el valor final. En la tabla 1.5, se describen brevemente las funciones de activación empleadas en RNA.^{232,233}

- f) Condiciones de aprendizaje. Son criterios de ajuste (error, número de iteraciones, objetivos deseados, etcétera) para la resolución de un problema y se establecen antes de la etapa de entrenamiento. Permite generar un vector cuyos componentes serán procesados por la función de activación para determinar los valores de salida.
- g) Datos de salida. Representan los valores que se desean obtener en la capa de salida de la MLP. El proporcionar a la red los valores de salida esperados, se establece que el entrenamiento de la red fue de tipo supervisado.

En RNA, cualquier configuración posible de pesos y umbral de la red es considerado en una dimensión del espacio formando una superficie de error. La aplicación de las funciones de entrenamiento consiste en converger (encontrar) el punto más bajo en esta superficie de error.

Una medida del error empleada frecuentemente es el promedio de los errores al cuadrado (MSE) calculada a partir de la suma de los errores al cuadrado sobre el número de registro (independiente del número de casos empleados para calcular el error), y considerada una medida del rendimiento de la RNA.²³⁴

Debido a su arquitectura simplificada y capacidad de aprendizaje a partir del procesamiento de información compleja se empleó el MLP como modelo de red neuronal artificial para la cuantificación de AU en presencia de interferentes que ocasionaron señales superpuestas y problemas de selectividad empleando Bi₂O₃-NPs/CPE.

Tabla 1.4 Funciones de activación empleadas en redes neuronales artificiales.

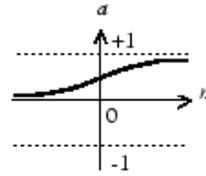
Nombre	Relación entrada/salida	Función	Gráfica	Símbolo
Limitador fuerte	$a = 0 \quad n < 0$ $a = 1 \quad n \geq 0$	<i>Hardlim</i>		
Limitador fuerte simétrico	$a = -1 \quad n < 0$ $a = +1 \quad n \geq 0$	<i>Hardlims</i>		
Lineal positiva	$a = 0 \quad n < 0$ $a = n \quad 0 \leq n$	<i>poslin</i>		
Lineal saturado	$a = 0 \quad n < 0$ $a = n \quad 0 \leq n \leq 1$ $a = 1 \quad n > 1$	<i>satlin</i>		
Lineal saturado simétrico	$a = -1 \quad n < -1$ $a = n \quad -1 \leq n \leq 1$ $a = +1 \quad n > 1$	<i>satlins</i>		
Lineal	$y = x$ $[-\infty, +\infty]$	<i>Purelin</i>		

*Sigmoidal
logarítmico*

$$a = \frac{1}{1 + e^{-x}}$$

[0, +∞]

Logsig

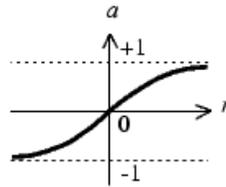


*Tangente
sigmoidal
hiperbólico*

$$a = \frac{e^n - e^{-n}}{e^n + e^{-n}}$$

[-1, +1]

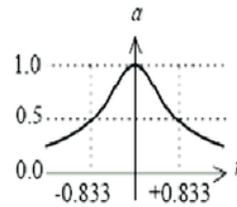
Tansig



*Función base
radial*

$$f(x) = e^{-x^2}$$

radbas



*Función base
triangular*

$$a = 1 - \text{abs}(i = \sum W_i X_i)$$

Tribas

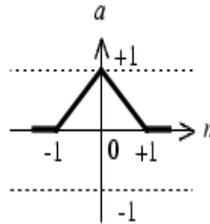


Tabla 1.5 Funciones de entrenamiento para redes neuronales artificiales.

Función	Código	Descripción
<i>Broyden-Fletcher-Goldfarb-Sanno</i> <i>Quiasi-Newton</i>	trainbfg	Se aplica para obtener un rendimiento aceptable en instancias de optimización no uniformes. Obtiene el mínimo de una función a partir de la propia función y su gradiente, buscando en cada iteración la inversa de la matriz.
<i>Regularización Bayesiana</i>	trainbr	Se minimiza la función del error por medio de un proceso de optimización no lineal y la optimización de la función de densidad de probabilidad es expresa en la varianza del error entre la salida programada y la estimada por la RNA usando una aproximación guassiana.
<i>Gradiente conjugado con reinicio de Powell/Beale</i>	traincgb	Disminuye el procesamiento computacional en actividades con inicializaciones constantes. Su funcionamiento se basa en el método del gradiente conjugado, con programación especial de interrupción de direcciones de búsqueda para evitar la generación de una dirección dependiente.
<i>Gradiente conjugado Fletcher-Powell</i>	traincgf	El gradiente conjugado es la base de funcionamiento y emplea derivadas de primer orden de la función. Se considera que la dirección de búsqueda es la dirección del descenso hacia el punto final.
<i>Gradiente conjugado Polak-Ribière</i>	traincgp	Fundamentado en el método de gradiente conjugado, y con una convergencia más rápida debido a las búsquedas lineales exactas basadas en un modelo general de función objetivo. Al no emplear la re-inicialización se presenta una tasa lineal de convergencia.
<i>Gradiente descendente</i>	traingd	A partir de la función de coste (definida como el error cuadrático entre los datos conocidos y los encontrados con el modelo) se estima los nuevos parámetros a partir de un punto de la función de error definida por los pesos sinápticos y se direcciona el mínimo global de la función hacia una dirección descendente.
<i>Gradiente descendente con momento</i>	traingdm	Es una variante del gradiente descendente donde se incorpora un factor de suavidad denominado momento cuya función es evitar mínimos locales y proporcionar al vector la inercia suficiente en la superficie del

error. El momento permite suavizar los cambios en los pesos eliminando las variaciones de alta frecuencia permitiendo incrementar la tasa de aprendizaje efectivo y una convergencia más rápida.

<i>Gradiente descendente con velocidad de aprendizaje adaptiva</i>	trainгда	Variante del método de gradiente descendente, diseñada para mantener un tamaño de paso de aprendizaje amplio y un aprendizaje estable en un sistema que responde a la complejidad del error local.
<i>Gradiente descendente con razón de aprendizaje adaptiva</i>	trainгдаx	Una variante del método del gradiente descendente que permite calcular en línea la tasa de aprendizaje haciendo un mejor ajuste y disminuir las oscilaciones.
<i>Levenberg - Marquardt</i>	trainlm	Empleada como técnica estándar para problemas de mínimos cuadrados no lineales. Presenta una rápida convergencia cuando la solución es cercana al mínimo local y lentitud cuando el mínimo local se encuentra lejos (garantizando la convergencia).
<i>Secante de un paso</i>	trainoss	Considerada como una aproximación en diferencias finitas del método Newton-Raphson, es un método que permite encontrar ceros en una función de forma iterativa usando una serie de raíces de las líneas secantes aproximando la raíz de la función.
<i>Incremental de orden aleatorio con función de aprendizaje</i>	trainr	Método de entrenamiento de la red con reglas de aprendizaje con actualización incremental después de la ejecución de cada entrada realizada en orden aleatorio.
<i>Retropropagación elástica</i>	trainrp	En este método (basado en el gradiente descendente y con transferencia continuas) el patrón de entrada genera la salida, calculando el error y propagando a las neuronas anteriores propiciando una única contribución al error total.
<i>Gradiente conjugado escalado</i>	trainscg	Este método iterativo es aplicado a sistemas dispersos demasiados grandes y su tratamiento se complica usando métodos directos. Permite una única solución a partir de la resolución del sistema de ecuaciones lineales con matrices simétricas minimizando las funciones convexas y sin necesidad de buscar linealidad en los procesos iterativos.

1.7 Justificación.

Los estilos de alimentación poco saludables han propiciado un aumento importante en enfermos diabéticos y sobrepeso, principal factor de riesgo para el desarrollo de la diabetes y la gota, padecimientos estrechamente relacionados.

La diabetes, se relaciona directamente con altas concentraciones de Glc en la sangre (hiperglicemia), y es una de las principales causas de ceguera, insuficiencia renal crónica, amputaciones de extremidades y la muerte prematura de los enfermos diabéticos. Desafortunadamente, nuestro país ocupa el séptimo lugar mundial en el número de casos de diabetes.

En el caso de la gota, esta se relaciona con concentraciones elevadas de AU en el organismo (hiperuricemia), ocasionando diferentes desordenes clínicos relacionados con la gota, destacándose problemas cardiovasculares, enfermedades renales crónicas y algunas enfermedades neurodegenerativas.

Para establecer medidas preventivas en el ser humano, es necesario el monitoreo de la Glc y AU, en muestras fisiológica empleando técnicas analíticas cuantitativas confiables, económicas y portátiles.

La cuantificación de los niveles de Glc y AU en pacientes se realiza empleando técnicas basadas en métodos espectrofotométricos enzimáticos, los cuales representan varias desventajas entre los que se destacan: alto costo de adquisición de la enzima, conservación del componente biológico (enzima) y los altos costos de operación-mantenimiento de los equipos empleados en el análisis.

La presente investigación propone el empleo de técnicas voltamperométricas a través del uso de electrodos no enzimáticos para la cuantificación de Glc y AU en muestras fisiológicas de forma selectiva, sencilla, rápida y de bajo costo. Los electrodos se elaborarán con pasta de carbono modificados con nanopartículas de óxidos metálicos o Metal-Organic Frameworks que han demostrado su utilidad para el análisis cuantitativo de estas especies químicas.

Además, se implementará una metodología basada DPV-RNA para aprovechar las ventajas de ambas técnicas y superar los inconvenientes de selectividad ocasionados por la presencia de interferentes en muestras complejas.

Por lo tanto, la importancia de esta investigación es contribuir al diseño de metodologías no enzimáticas fácilmente operables, selectivas, fiables, económicas y con un requerimiento mínimo de muestra, con potencial para ser incorporadas a la sociedad a través de un producto comercial, superando las limitaciones de los biosensores comerciales para medir Glc y AU.

1.8 Objetivo general y objetivos específicos

Desarrollar metodologías electroanalíticas empleando electrodos de pasta de carbono modificados con nanoestructuras de óxidos metálicos o Metal-Organic Frameworks para la cuantificación selectiva, precisa y exacta de glucosa y ácido úrico en muestras fisiológicas.

Los objetivos específicos son los siguientes:

- Construir electrodos de pasta de carbono modificados mediante la elaboración de mezcla de polvo de grafito y material modificante (nanoestructuras de óxidos metálicos o MOF) para su uso en el electroanálisis de glucosa o ácido úrico.
- Optimizar las proporciones de los componentes en la pasta de carbono mediante la preparación de diversas mezclas de polvo de grafito y modificante para maximizar la señal analítica en la oxidación del analito.
- Optimizar el medio de análisis mediante el ajuste del valor de pH de la solución electrolítica para maximizar la respuesta analítica hacia el analito de interés.
- Optimizar los parámetros correspondientes a la técnica voltamperometría diferencial de pulsos empleando el diseño de Experimentos Box-Behnken para maximizar la respuesta analítica hacia el analito de interés.
- Realizar la caracterización analítica del método electroanalítico optimizado empleando análisis estadístico para evaluar su utilidad para la cuantificación del analito de interés.

- Evaluar los resultados obtenidos mediante la metodología electroanalítica optimizada y la metodología oficial en la determinación del analito de interés empleando pruebas estadísticas para evaluar la fiabilidad de la metodología propuesta.
- Implementar una red neuronal artificial mediante el uso del modelo perceptrón multicapa y las metodologías electroquímicas optimizadas para la cuantificación del analito de interés.

CAPÍTULO II. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Reactivos.

Todas las soluciones se prepararon utilizando reactivos de grado analítico y agua desionizada (18 M Ω ·cm).

Los reactivos empleados fueron ácido úrico (AU), glucosa (Glc), ácido ascórbico (AA), cafeína, paracetamol (PAR) y ácido oxálico (AO), todos fueron grado analítico (marca Sigma-Aldrich).

Los electrodos de pasta de carbono fueron elaborados con polvo de grafito (<20 micrómetros de diámetro) y aceite de parafina, ambos marca Sigma-Aldrich.

Los materiales modificantes empleados en la elaboración de los electrodos de pasta de carbono modificados fueron nanopartículas de Fe₂O₃ (<50 nm), nanopartículas de Bi₂O₃ (<95 nm) y MOF MIL-100 Mn, los dos primeros marca Sigma-Aldrich.

El MOF MIL-100 Mn fue sintetizado por la técnica reportada por Reinsch & Stock,²³⁵ Se empleó ácido trimésico (H₃BTC), nitrato de manganeso (II) tetrahidratado (Mn(NO₃)₂·4H₂O), metanol y etanol, todos marca Sigma-Aldrich. Se mezcló 400 mg de H₃BTC) en 18 mL de metanol y 2 mL de una solución 1 M Mn(NO₃)₂·4H₂O disuelta en metanol. La mezcla fue calentada por 2 horas a 125°C con agitación y en un recipiente cerrado. Posteriormente, se filtró y se lavó con etanol. El polvo de color marrón fue secado a 65°C en una estufa y posteriormente se guardó para su uso en la fabricación de los electrodos modificados.

2.2 Mediciones electroquímicas.

Las mediciones electroquímicas se realizaron en un potenciostato/galvanostato BASInc Epsilon, un medio electrolítico optimizado y una celda electroquímica convencional de tres electrodos. En la tabla 2.1, se reportan los sistemas de tres electrodos y la solución electrolítica empleada en cada metodología.

Tabla 2.1 Sistemas electroquímicos para las metodologías voltamperométricas.

Analito	Electrodo de trabajo	Electrodo de referencia	Electrodo auxiliar	Solución electrolítica
Glucosa	Electrodo de pasta de carbono modificado con nanopartículas de Fe ₂ O ₃ (Fe ₂ O ₃ -NPs/CPE)	Ag/AgCl (3 M KCl)	Barra de grafito	0.1 M KCl en medio alcalino (0.1 M NaOH, pH 12.8)
Glucosa	Electrodo de pasta de carbono modificado con MOF MIL-100 Mn (MOF MIL 100 Mn/CPE)	Ag/AgCl (3 M KCl)	Barra de grafito	0.1 M ABS (pH 5.5).
Ácido úrico	Electrodo de pasta de carbono modificado con nanopartículas de Bi ₂ O ₃ (Bi ₂ O ₃ -NPs/CPE)	Ag/AgCl (3 molL ⁻¹ KCl)	Barra de grafito	0.1 M ABS (pH 5.5).

Nanopartículas (NPs), Materiales del Instituto Lavoisier (MIL), Metal Organic-Framework (MOF), electrodo de pasta de carbono (CPE), solución buffer de acetato (ABS), molaridad (M, molL⁻¹).

2.3 Preparación de los electrodos de pasta de carbono.

El electrodo de pasta de carbono modificado se preparó de la siguiente manera (figura 2.1 A): diferentes proporciones del material modificante se mezclaron con polvo de grafito y aceite de parafina (aglutinante) hasta obtener 0.4 g de una pasta uniforme. Posteriormente la pasta homogénea se incorporó y compactó en un tubo de plástico (tubo de jeringa de insulina). Después, se insertó un contacto de cobre en un extremo. Finalmente, la superficie del electrodo se pulió (formando líneas en un solo sentido) utilizando una hoja de papel con alta blancura (la operación de pulido se realizó de la misma forma después de cada lectura). Con fines comparativos, se construyeron electrodos de pasta de carbono sin modificar (0%) usando la misma técnica (figura 2.1 B).

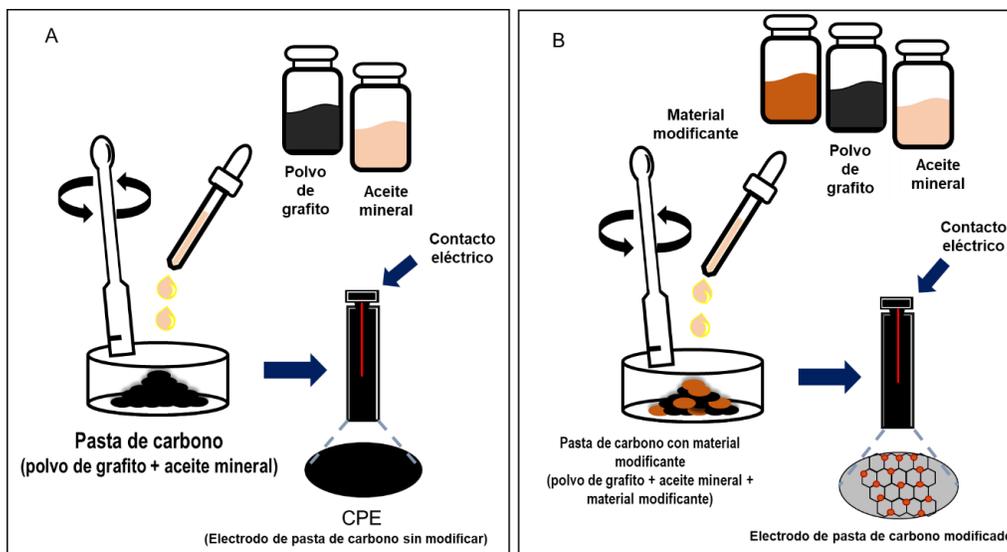


Figura 2.1. Proceso de elaboración de electrodos de pasta de carbono A) sin modificar y B) modificado.

2.4 Estudio del rendimiento electroquímico del CPE modificado

Se evaluó la respuesta electroquímica de los electrodos de pasta de carbono modificados en ausencia y presencia del analito disuelto en solución electrocatalítica (tabla 2.2). Para fines comparativos se empleó un CPE en ausencia y presencia del analito disuelto en la solución electrocatalítica empleando las mismas condiciones.

Tabla 2.2 Condiciones para evaluar el rendimiento electroquímico de los CPE modificados

Analito	Electrodo de trabajo	Técnica	Velocidad de barrido	Condiciones	Solución electrolítica
Glucosa (0.1 mM)	Fe ₂ O ₃ -NPs/CPE	CV	100 mVs ⁻¹	0 V a 1,5 V (primer segmento) 1.5 V a -1.5 (segundo segmento) -1.5 V a 1.5 (tercer segmento) Barrido en sentido anódico.	0.1 M KCl en medio alcalino (0.1 M NaOH, pH 12.8)
Glucosa (1 μM)	MOF MIL-100 Mn/CPE	CV	100 mVs ⁻¹	0 V a 1,2 V (primer segmento) 1.2 V a -1.2 (segundo segmento) -1.2 V a 1.2 (tercer segmento) Barrido en sentido anódico.	0.1 M ABS (pH 5.5)
Ácido úrico (0.5 mM)	Bi ₂ O ₃ -NPs/CPE	CV	100 mVs ⁻¹	0 V a 1,2 V (primer segmento) 1.2 V a -1.2 (segundo segmento) -1.2 V a 1.2 (tercer segmento) Barrido en sentido anódico.	0.1 M ABS (pH 5.5)

Voltamperometría cíclica (CV), nanopartículas (NPs), Materiales del Instituto Lavoisier (MIL), electrodo de pasta de carbono (EPC), solución buffer de acetato (ABS), molaridad (M, molL⁻¹).

2.5 Optimización del porcentaje de modificante en CPE.

Se evaluó la señal de máxima corriente anódica usando diferentes proporciones de modificante en la mezcla composite de pasta de carbono con una solución de analito disuelta en la solución electrolítica (tabla 2.3).

Tabla 2.3 Condiciones para la optimización del porcentaje de modificante en el CPE.

Analito	Electrodo de trabajo	Técnica	Condiciones	Solución electrolítica
Glucosa (0.1 mM)	Fe ₂ O ₃ -NPs/CPE	DPV	Paso potencial de 4 mV, ancho de pulso 50 ms, período de pulso 200 ms, amplitud de pulso de 50 mV Ventana de trabajo de 0,5 V a 1,5 V	0.1 M KCl en medio alcalino (0.1 M NaOH, pH 12.8)
Glucosa (1 μM)	MOF MIL-100 Mn/CPE	LSV	Velocidad de barrido 100 mVs ⁻¹ Ventana de trabajo 0 V-1.2 V Barrido en sentido anódico.	0.1 M ABS (pH 5.5)
Ácido úrico (0.5 mM)	Bi ₂ O ₃ -NPs/CPE	LSV	Velocidad de barrido 100 mVs ⁻¹ Ventana de trabajo 0 V-1.2 V Barrido en sentido anódico.	0.1 M ABS (pH 5.5)

Voltamperometría diferencial de pulso (DPV), voltamperometría de barrido lineal (LSV), electrodo de pasta de carbono (CPE), Metal Orgánic-Frameworks (MOF), Material del Instituto Lavoisier (MIL), nanopartículas (NPs), solución buffer de acetato (ABS), molaridad (M, molL⁻¹).

En cada una de las propuestas metodológicas desarrolladas en esta investigación, se seleccionó la proporción de modificante que generó la mayor intensidad de corriente para el analito estudiado.

2.6 Optimización del pH del medio electrolítico.

Se evaluó el efecto de la variación de pH de la solución electrolítica respecto al proceso de oxidación electrocatalítica en la superficie del sensor de pasta de carbono modificado (tabla 2.4). En cada una de las propuestas metodológicas desarrolladas en este trabajo de investigación, se seleccionó el pH de la solución electrolítica que generó la mayor intensidad de corriente de pico anódico para el analito estudiado.

Tabla 2.4 Condiciones de optimización del pH del medio electrolítico.

Analito	Electrodo de trabajo	Técnica	Condiciones	Solución electrolítica
Glucosa (0.1 mM)	Fe ₂ O ₃ -NPs/CPE	DPV	Paso potencial de 4 mV, ancho de pulso 50 ms, período de pulso 200 ms, amplitud de pulso de 50 mV Ventana de trabajo de 0,5 V a 1,5 V	0.1 M KCl en medio alcalino (0.1 M NaOH, pH 12.8)
Glucosa (1 μM)	MOF MIL-100 Mn/CPE	LSV	Velocidad de barrido 100 mVs ⁻¹ Ventana de trabajo 0 V-1.2 V	0.1 M ABS (pH 5.5)
Ácido úrico (0.5 mM)	Bi ₂ O ₃ -NPs/CPE	LSV	Velocidad de barrido 100 mVs ⁻¹ Ventana de trabajo 0 V-1.2 V	0.1 M ABS (pH 5.5)

Voltamperometría diferencial de pulso (DPV), Voltamperometría de barrido lineal (LSV), electrodo de pasta de carbono (CPE), Metal Orgánico-Frameworks (MOF), Material del Instituto Lavoisier (MIL), nanopartículas (NPs), solución buffer de acetato (ABS), molaridad (M, molL⁻¹).

2.7 Evaluación del efecto de la concentración del analito en la respuesta electroanalítica

La voltamperometría diferencial de pulso se empleó como técnica electroanalítica en las tres metodologías desarrolladas empleando diferentes concentraciones del analito (tabla 2.5).

Tabla 2.5 Condiciones de evaluación del efecto de la concentración del analito en la respuesta electroanalítica

Analito	Electrodo de trabajo	Técnica	Condiciones	Solución electrolítica
Glucosa	Fe ₂ O ₃ -NPs/CPE	DPV	Paso potencial de 4 mV, ancho de pulso 50 ms, período de pulso 200 ms, amplitud de pulso de 50 mV Ventana de trabajo de 0,5 V a 1,5 V	0.1 M KCl en medio alcalino (0.1 M NaOH, pH 12.8)
Glucosa	MOF MIL-100 Mn/CPE	DPV	Paso potencial de 5 mV, ancho de pulso 70 ms, período de pulso 280 ms, amplitud de pulso de 70 mV Ventana de trabajo 0 V-1.0 V	ABS (0.1 M)
Ácido úrico	Bi ₂ O ₃ -NPs/CPE	DPV	Paso potencial de 6 mV, ancho de pulso 30 ms, período de pulso 100 ms, amplitud de pulso de 70 mV Ventana de trabajo 0 V-1.0 V	ABS (0.1 M)

Voltamperometría diferencial de pulso (DPV), electrodo de pasta de carbono (CPE), Metal Orgánico-Frameworks (MOF), Material del Instituto Lavoisier (MIL), nanopartículas (NPs), solución buffer de acetato (ABS), molaridad (M, molL⁻¹).

2.8 Diseño Box-Behnken para la optimización de DPV.

Un diseño Box-Behnken a tres niveles se utilizó para la optimización de los parámetros de la técnica DPV (cuatro factores) partiendo de los datos mostrados en la tabla 2.6. El software Minitab 13® se empleó para el diseño de la matriz de experimentos. Los experimentos se realizaron por triplicado, y se consideró el promedio de la corriente de respuesta máxima.

Tabla 2.6 Condiciones iniciales de las variables de la DPV para el diseño Box-Behnken.

FACTOR	CODIFICACION	-1	0	1
Paso de potencial (mV)	A	2	4	6
Ancho de pulso (ms)	B	30	50	70
Periodo de pulso (ms)	C	100	200	300
Amplitud de pulso (mV)	D	30	50	70

2.9 Caracterización analítica de los métodos desarrollados.

Los métodos analíticos desarrollados en este documento fueron validados para demostrar su desempeño en la tarea de cuantificación de Glc y AU. Se emplearon las recomendaciones emitidas por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés).^{236,237}

2.9.1 Intervalo de linealidad.

Para determinar el intervalo de concentraciones en el que la corriente anódica máxima obtenida, con el electrodo de pasta de carbono modificado presenta una relación lineal con la concentración del analito, se ajustó la curva de calibración al modelo lineal mostrado en la ecuación 6.

$$y = b + mx$$

Ecuación 7. Modelo lineal para el ajuste de la curva de calibración (ecuación de la pendiente).

Se prepararon estándares con diferentes concentraciones del analito, y se midieron por triplicado bajo las condiciones optimizadas en cada uno de los métodos propuestos.

Los promedios de la señal de respuesta (máxima intensidad de corriente de pico anódico) para cada concentración, se emplearon para graficar la curva de calibración. A partir de la curva de calibración resultante y el análisis de regresión por el método de mínimos cuadrados se calculó la pendiente (m), el intercepto (b) y el coeficiente de determinación (R^2).

Este procedimiento se realizó en cada una de las metodologías presentadas en esta tesis.

2.9.2 Sensibilidad analítica.

Se aplicó el análisis de regresión por el método de mínimos cuadrados a la curva de calibración para cada analito, y se consideró el valor de la pendiente como la sensibilidad analítica (s) para describir el cambio de respuesta por unidad de concentración del método analítico desarrollado.

2.9.3 Límite de cuantificación (LOQ).

En cada uno de los métodos propuestos, se evaluó el límite de cuantificación con la finalidad de conocer la cantidad mínima del analito estudiado que se puede cuantificar de manera precisa y exacta con cada uno de los sensores. Para calcular LOQ, se empleó la ecuación 7:

$$LOQ = (10 * s_{y/x}) / s$$

Ecuación 8. Determinación de límite de cuantificación (LOQ).

donde el LOQ está dado en las unidades de concentración, $S_{y/x}$ es el error típico del ajuste, s es la sensibilidad analítica y el coeficiente 10 es igual a la desviación estandar del blanco multiplicado por diez.

2.9.4 Límite de detección (LOD).

En cada uno de los métodos propuestos, se evaluó el límite de detección con la finalidad de conocer la cantidad mínima del analito estudiado que se puede detectar con fiabilidad

estadística empleando cada uno de los sensores modificados. Para calcular LOD, se empleó la ecuación 8:

$$LOD = (3 * s_{y/x}) / s$$

Ecuación 9. Determinación de límite de detección (LOD).

donde el LOD está dado en las unidades de medida, $s_{y/x}$ es la desviación estándar de la curva, el valor de s es el valor de la sensibilidad analítica y el coeficiente 3 es igual a la desviación estándar del blanco multiplicado por tres.

2.9.5 Repetibilidad.

La repetibilidad del sensor se determinó realizando diez mediciones sucesivas utilizando una solución del analito en condiciones optimizadas. Se calculó el valor de porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD). El valor de RSD de las mediciones debe ser <10% para demostrar la precisión en las mediciones realizadas con el sensor modificado.

2.9.6 Reproducibilidad.

Se elaboraron de forma independiente cinco sensores optimizados para evaluar la reproducibilidad entre electrodos, utilizando una solución del analito bajo condiciones optimizadas. Se consideró el promedio del valor de %RSD para las evaluaciones realizadas con cada sensor modificado. Se establece el valor de RSD <10% para demostrar la precisión en las mediciones obtenidas con los diferentes electrodos modificados.

2.9.7 Selectividad.

La selectividad del sensor modificado se evaluó utilizando diferentes especies químicas que generalmente coexisten con el analito en muestras de orina. AA, cafeína y AU fueron empleados en el estudio de selectividad en los sensores Fe_2O_3 -NPs/CPE y MOF MIL-100 Mn/CPE; en el caso del Bi_2O_3 -NPs/CPE se utilizaron Glc, cafeína, AA, PAR y AO.

Se emplearon tres concentraciones para la evaluación de la posible interferencia: a) concentración del interferente 10 veces mayor que la concentración del analito, b) concentración del interferente igual a la del analito y c) concentración del interferente 10 veces menor que la del analito.

El efecto de interferencia a la señal de respuesta se evaluó mediante el error relativo porcentual de acuerdo con la ecuación 9.

$$\% \text{ error relativo} = \frac{\text{señal esperada} - \text{señal obtenida}}{\text{señal esperada}} \times 100$$

Ecuación 10. Error relativo porcentual para la evaluación de la selectividad.

2.10 Análisis de muestras reales.

Se emplearon muestras de orina humana para cuantificar Glc o AU con cada uno de los sensores construidos en la presente investigación.

Las muestras fueron diluidas en la solución electrolítica optimizada y posteriormente fueron cuantificadas utilizando las metodologías también optimizadas.

La concentración del analito se calculó a partir de la ecuación de la curva de calibración construida en cada uno de los casos.

Los resultados obtenidos por las metodologías propuestas fueron comparados estadísticamente, mediante la prueba t-student pareada²³⁸ con los resultados obtenidos por las metodologías espectrofotométricas enzimáticas, para determinar si hay diferencias significativas o no entre ellas. En la ecuación 10, se describe la fórmula para t-student donde \bar{d} es la diferencia entre los valores pareados, μ_d representa la media poblacional de todas las diferencias pareadas, s_d la desviación estándar de las diferencias de los datos pareados y N es el número de muestras de datos pareados.

$$t = \frac{\bar{d} - \mu_d}{\frac{S_d}{\sqrt{N}}}$$

Ecuación 11. Estadístico de prueba t-student pareada.

2.11 Red neuronal artificial

Para el desarrollo de la red neuronal artificial se consideró el sensor Bi₂O₃-NPs/CPE y los parámetros optimizados en la metodología para la cuantificación de AU en presencia de PAR, AA y AO.

2.11.1 Mediciones electroquímicas.

Las mediciones electroquímicas se realizaron en un potenciostato/galvanostato BASInc modelo Epsilon y una celda electroquímica convencional de tres electrodos empleando un electrodo 10% Bi₂O₃-NPs/CPE Ag/AgCl (3 M KCl) y una barra de grafito de alta pureza (6 mm de diámetro), como electrodos de trabajo, de referencia y contraelectrodo, respectivamente. El electrolito soporte fue ABS 0.1 M a pH 5.5.

La DPV se empleó como técnica electroanalítica programándola con los parámetros óptimos obtenidos anteriormente: paso de potencial 6 mV, ancho de pulso 30 ms, periodo de pulso 300 ms y amplitud de pulso 70 mV.

2.11.2 Mezclas para la etapa de entrenamiento y prueba.

Utilizando un diseño factorial de tres niveles, se obtuvieron 27 combinaciones empleando diferentes concentraciones de AU, PAR, AA, y OA que se usan en la etapa de entrenamiento de la RNA (tabla 2.7). Para la etapa de prueba se emplearon 10 combinaciones de diferentes concentraciones de AU, PAR, AA y AO, como se muestra en la tabla 2.8.

Tabla 2.7 Mezclas de AU, PAR, AA y AO en el entrenamiento de la RNA.

Ácido úrico (AU) mM	Paracetamol (PAR) mM	Ácido ascórbico (AA) mM	Ácido oxálico (AO) mM
0.10	0.10	0.10	0.10
0.13	0.12	0.17	0.76
0.17	0.14	0.25	1.42
0.20	0.27	0.76	0.17
0.24	0.29	0.83	0.83
0.27	0.31	0.90	1.49
0.31	0.45	1.42	0.25
0.34	0.47	1.49	0.90
0.38	0.48	1.56	1.56
0.41	0.16	0.32	0.32
0.45	0.18	0.39	0.98
0.48	0.20	0.47	1.63
0.52	0.33	0.98	0.39
0.55	0.35	1.05	1.05
0.58	0.37	1.12	1.71
0.62	0.50	1.63	0.47
0.65	0.52	1.71	1.12
0.69	0.54	1.78	1.78
0.72	0.22	0.54	0.54
0.76	0.23	0.61	1.20
0.79	0.25	0.68	1.85
0.83	0.39	1.20	0.61
0.86	0.41	1.27	1.27
0.90	0.43	1.34	1.93
0.93	0.56	1.85	0.68
0.97	0.58	1.93	1.34
1.00	0.60	2.00	2.00

Tabla 2.8 Mezcla de AU, PAR, AA y AO en la etapa de prueba de la RNA.

Ácido úrico (AU) mM	Paracetamol (PAR) mM	Ácido ascórbico (AA) mM	Ácido oxálico (AO) mM
0.18	0.33	1.65	0.79
0.26	0.37	1.83	1.48
0.35	0.42	2.00	0.27
0.43	0.46	0.10	0.96
0.51	0.51	0.27	1.65
0.59	0.55	0.45	0.45
0.67	0.60	0.62	1.14
0.75	0.10	0.79	1.83
0.84	0.15	0.96	0.62
0.92	0.19	1.14	1.31

Las soluciones fueron preparadas en ABS 0.1 M (pH=5.5) y analizadas con los parámetros optimizados del Bi₂O₃-NPs/CPE y la DPV.

2.11.3 Red Neuronal Artificial para cuantificar ácido úrico en presencia de interferentes.

Se empleó una arquitectura perceptrón multicapa y la función de entrenamiento Levenberg-Marquardt para la RNA. El software Matlab R2015a, fue usado para realizar la programación, entrenamiento y prueba de la RNA.

Los datos de entrenamiento y prueba fueron normalizados en el intervalo de [-1, +1] para facilitar el proceso de entrenamiento de la RNA.

La evaluación del ajuste correcto de la RNA se realiza mediante el error medio cuadrático (EMC)^{239,240} comparando los valores de salida (*C_j obtenido*) con los valores de concentración esperados (*C_j esperado*), de acuerdo con la ecuación 11. Al existir diferencias significativas, el algoritmo de entrenamiento ajusta los pesos de las conexiones entre las neuronas.

$$EMC = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N (C_j \text{ esperado} - C_j \text{ obtenido})^2$$

Ecuación 12. Cálculo del error medio cuadrático (EMC) para la red neuronal artificial.

Además, se consideró el porcentaje de recobro (PR) para las muestras de AU y evaluar la capacidad de predicción de información de la RNA,²⁴¹ de acuerdo con la ecuación 12, donde Y_i es el valor obtenido, y_i el valor esperado y N es el número de muestras.

$$PR = \frac{\sum_{i=1}^N 100 * (1 + \frac{Y_i - y_i}{y_i})}{N}$$

Ecuación 13. Porcentaje de recobro (PR) aplicado a la red neuronal artificial.

Además, se realizó una prueba de validación cruzada basada en la técnica K-fold ($k=4$ para evaluar el rendimiento de la RNA. Con esta técnica, todo el conjunto de datos se divide en k subconjuntos (entrenamiento y prueba) y el método de reserva se repite k veces. Cada vez, uno de los k subconjuntos se usa como conjunto de prueba y los otros $k - 1$ subconjuntos, se usan para entrenamiento (tabla 2.9).)²⁴²

Tabla 2.9 División de datos para validación cruzada usando K-fold.

RNA 1	Datos de prueba	Datos entrenamiento	Datos entrenamiento	Datos entrenamiento
RNA 2	Datos entrenamiento	Datos de prueba	Datos entrenamiento	Datos entrenamiento
RNA 3	Datos entrenamiento	Datos entrenamiento	Datos de prueba	Datos entrenamiento
RNA 4	Datos entrenamiento	Datos entrenamiento	Datos entrenamiento	Datos de prueba

El objetivo es analizar el rendimiento de la RNA con diferentes subconjuntos de entrenamiento y prueba para mostrar la capacidad del modelo en la tarea de cuantificación de AU en presencia de los interferentes.

CAPÍTULO III. RESULTADOS

3.1 Sensor no enzimático modificado con nanopartículas de Fe_2O_3 para cuantificar glucosa.

A continuación, se describen y discuten los resultados obtenidos en el desarrollo de la metodología para cuantificar Glc en medio básico empleando electrodos de pasta de carbono modificados con nanopartículas de óxido de hierro (III).

3.1.1 Estudio del sistema electroquímico mediante CV.

Se empleó CV (barrido en dirección anódica a 100 mVs^{-1}) para evaluar el comportamiento del CPE y el $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-NPs/CPE}$ en una solución 0.1 M de KCl ajustada a $\text{pH } 12.8$. En la figura 3.1, se observa en el voltamperograma obtenido usando el CPE un proceso anódico con un potencial de máxima corriente anódica en 1.3 V , el cual se puede atribuir a la oxidación de grafito y formación de grupos funcionales ($-\text{C}=\text{O}$, $-\text{C}-\text{OH}$, $-\text{C}-\text{COOH}$, $-\text{C}=\text{OH}^+$ o $\text{C}-\text{H}$)²⁴³ sobre la superficie del electrodo. Al invertir el barrido se puede observar un proceso catódico con un potencial de mínima corriente de -0.947 V asociado a la reducción del oxígeno.

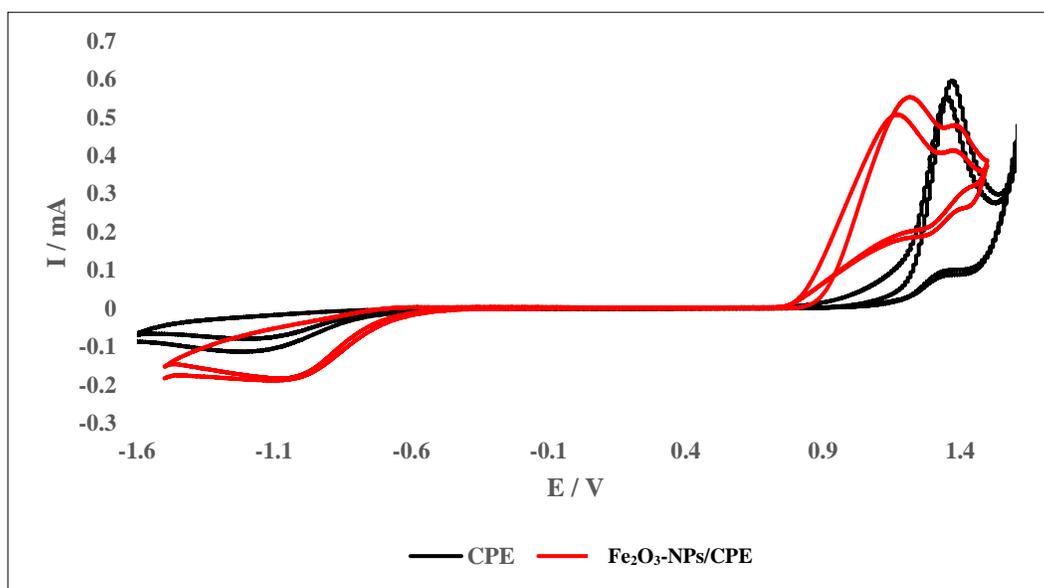


Figura 3.1 CVs de CPE y el 10% $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-NPs/CPE}$ en solución alcalina sin glucosa
Velocidad de barrido 100 mVs^{-1} (sentido anódico) en tres segmentos, primer segmento de barrido de 0 V a 1.5 V , segundo segmento de 1.5 V a -1.5 V y tercer segmento de -1.5 V a 1.5 V .

En el CV correspondiente al $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-NPs/CPE}$ a diferencia del obtenido con CPE, se observa un proceso anódico con una corriente máxima de pico alrededor de 1 V , el cual se atribuye a la oxidación del $\text{R-Fe}^{3+}\text{-OH}_{\text{ads}}$ formado en la superficie del $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-NPs/CPE}$ (ecuación 13 A)

a Fe (IV) de la especie $R-Fe=O^{244,245}$ (ecuación 13 B), proceso favorecido por el pH básico del medio.

Al invertir el barrido no se hace evidente ninguna onda catódica relacionada al proceso de reducción de $R-Fe=O$ a $R-Fe^{3+}-OH_{ads}$ lo cual indica que el $R-Fe=O$ es inestable. Al seguir el barrido se observa una onda catódica más intensa que la obtenida con el CPE, a un potencial de mínima corriente de pico de -0.95 V que correspondería a la reducción de $R-Fe^{3+}-OH_{ads}$ a Fe (II) en forma de $Fe(OH)_2$ junto con el proceso de reducción del oxígeno adsorbido en CPE. Al realizar el segundo barrido anódico se puede observar una onda anódica muy ensanchada que correspondería a la transformación del Fe (II) previamente formado a $R-Fe^{3+}-OH_{ads}$.

En la figura 3.2, se presentan los voltamperogramas cíclicos, obtenidos con los electrodos en estudio aplicados a solución de Glc 0.1 mM disuelta en KCl (0.1 M) y pH 12.8 . En el caso del CPE se puede observar un comportamiento muy parecido al mostrado en ausencia de Glc y no se observa un pico redox relacionado a la oxidación de esta, lo que sugiere que la Glc no se oxida en la superficie del CPE.

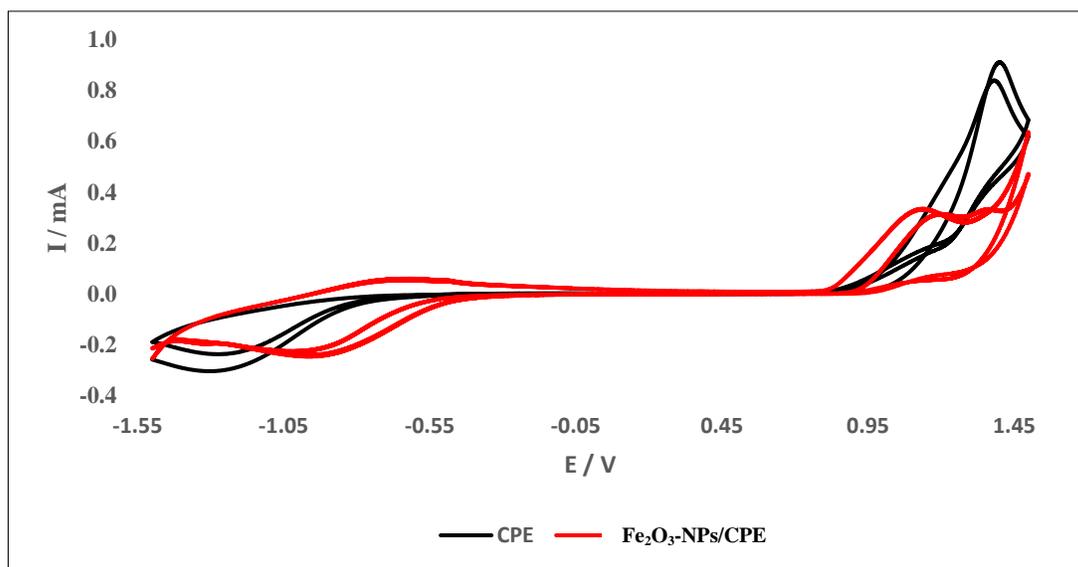
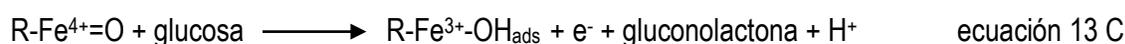
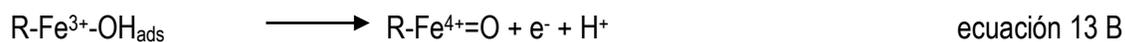


Figura 3.2 CVs de CPE y 10% Fe_2O_3 -NPs en 0.1 mM de glucosa en 0.1 M KCl (pH 12.8)
Velocidad de barrido 100 mVs^{-1} (sentido anódico) en tres segmentos, primer segmento de barrido de 0 V a 1.5 V, segundo segmento de 1.5 V a -1.5 V y tercer segmento de -1.5 V a 1.5 V.

Sin embargo, al comparar el voltamperograma del Fe₂O₃-NPs/CPE en presencia y ausencia de Glc, se observan diferencias en la corriente registrada en el proceso asociado a la oxidación del Fe (III) a Fe (IV), esta última especie oxida a la Glc (ecuación 13 C) mediante un proceso puramente redox, lo anterior afecta la onda anódica a 1 V que se puede relacionar a la cantidad de Glc en el medio.²⁴⁶



Ecuación 14. Mecanismo de oxidación no enzimática de la glucosa empleando Fe₂O₃-NPs/CPE en medio básico.

Los resultados previos sugieren que las nanopartículas de Fe₂O₃ permiten la determinación indirecta de Glc mediante un proceso electroquímico-químico que se muestra en la figura 3.3.

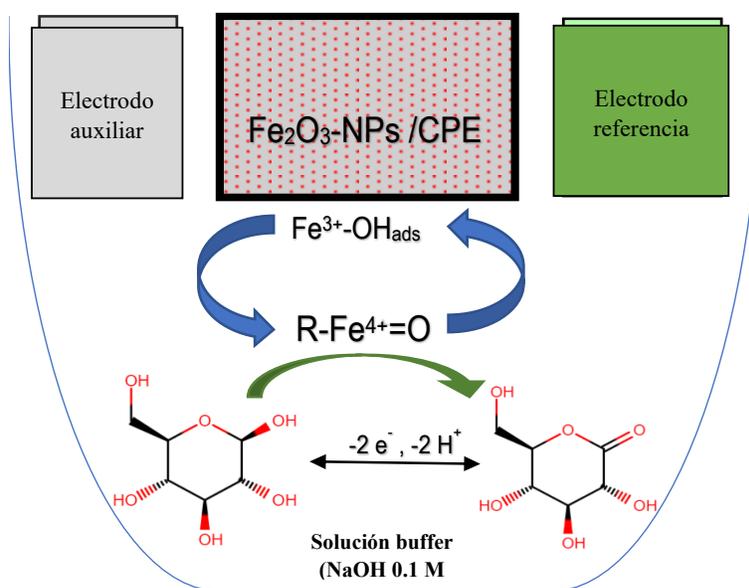


Figura 3.3 Mecanismo de respuesta electroquímica hacia glucosa usando el Fe₂O₃-NPs/CPE.

3.1.2 Optimización del porcentaje de Fe₂O₃-NPs en CPE.

Se realizó la evaluación y optimización del porcentaje de Fe₂O₃-NPs en el CPE mediante DPV empleando una solución de Glc 0.1 mM en KCl a pH 12.8; se probaron porcentajes del 0%, 5%, 10%, 15%, 20% y 25%. Los resultados se presentan en la figura 3.4 y se puede observar que en el voltamperograma correspondiente al CPE (0%) se tiene un proceso anódico con un potencial de corriente máxima de 1.3 V, el cual como se mencionó antes, estaría asociado a la oxidación del grafito en la superficie del electrodo.

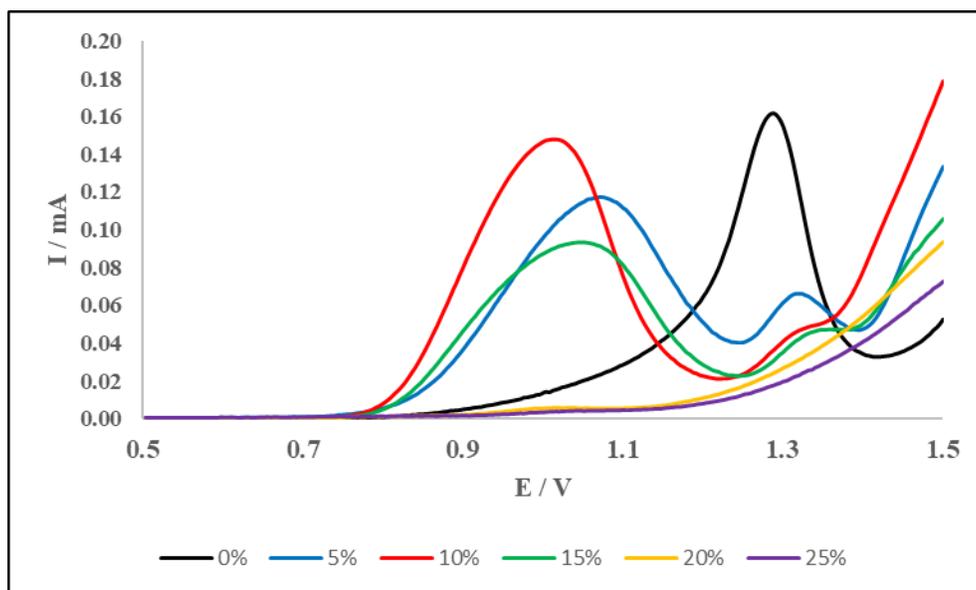


Figura 3.4 Optimización del porcentaje de Fe₂O₃-NPs en el CPE en 0.1 mM de glucosa a pH 12.8. Obtenidas mediante DPV (Paso de potencial 4 mV, ancho de pulso 50 ms, período de pulso 200 ms, amplitud de pulso 50 mV) y una ventana de trabajo de 0.5 V a 1.5 V.

La presencia de las Fe₂O₃-NPs provoca la generación de una onda anódica (1 V) que asociamos a la oxidación de la Glc presente en el medio. Al comparar la corriente de los voltamperogramas obtenidos con los diferentes porcentajes de Fe₂O₃-NPs, se puede observar que un 10% de nanopartículas en el composite presentó la mayor corriente, lo cual sugiere que esta proporción mejora la respuesta al proceso de oxidación de la Glc. Considerando esto, se eligió 10% de Fe₂O₃-NPs como la proporción optimizada para los experimentos posteriores.

Porcentajes de nanopartículas en CPE mayores a 10% disminuyen la intensidad de corriente anódica debido a la propiedad semiconductor que presenta el óxido metálico dificultando el paso de corriente en el proceso electrocatalítico.

3.1.3 Optimización del pH de trabajo para el sistema electroquímico.

Posteriormente, se realizó la optimización del pH de trabajo del sistema usando DPV y ajustando diferentes valores de pH (9.58 – 13.1) en el sistema a evaluar, lo anterior debido al rol del OH^- en el proceso de oxidación de las Fe_2O_3 -NPs y Glc, efecto que se presenta en la figura 3.5. Se observa que la corriente de pico anódico aumenta proporcionalmente al cambio de pH. Esto indica que a valores de pHs altos se estabiliza mejor la especie Fe^{4+} , y se incrementa la señal anódica relacionada a la cantidad de Glc en el medio.

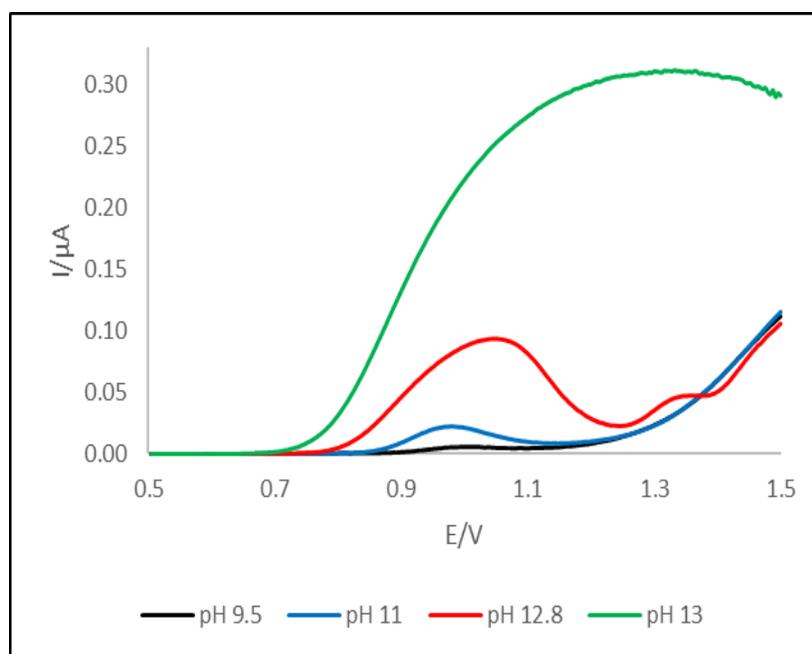


Figura 3.5 Optimización de pH del medio usando el 10% Fe_2O_3 -NPs/CPE en 0.1 mM de glucosa (0.1 M KCl a pH 12.8). DPV (Paso de potencial 4 mV, ancho de pulso 50 ms, período de pulso 200 ms, amplitud de pulso 50 mV) y una ventana de trabajo de 0.5 V a 1.5 V.

Para fines del presente estudio, se seleccionó un pH de 12.8 debido a que la onda anódica se encuentra mejor definida.

3.1.4 Optimización de los parámetros de la DPV.

Se realizaron los 27 experimentos propuestos por el diseño Box-Behnken para maximizar la corriente anódica de oxidación electroquímica de la Glc (0.1 mM). En la tabla 3.1, se presenta los resultados de las mediciones obtenidas para cada experimento por triplicado. Los experimentos confirmatorios (25, 26 y 27) presentaron un %RSD promedio igual a 2.35%, confirmando la precisión de las mediciones (<10% RSD).

Tabla 3.1 Experimentos para la optimización de DPV usando Fe_2O_3 -NPs/CPE.

No. Experimento	A mV	B ms	C ms	D mV	Promedio mA	Desviación estándar	% RSD
16	4	70	300	50	0.1353	0.0007	0.5330
10	6	50	200	30	0.0861	0.0024	2.8163
2	6	30	200	50	0.1340	0.0016	1.1945
21	4	30	200	30	0.0775	0.0010	1.3471
22	4	70	200	30	0.0680	0.0006	0.8945
27	4	50	200	50	0.1213	0.0019	1.5324
19	2	50	300	50	0.0987	0.0005	0.5361
11	2	50	200	70	0.1580	0.0017	1.0538
13	4	30	100	50	0.1263	0.0002	0.1828
12	6	50	200	70	0.1995	0.0042	2.0843
9	2	50	200	30	0.0632	0.0018	2.8423
4	6	70	200	50	0.1275	0.0005	0.3868
15	4	30	300	50	0.1051	0.0007	0.6475
7	4	50	100	70	0.1772	0.0010	0.5654
5	4	50	100	30	0.0862	0.0005	0.5356
17	2	50	100	50	0.1276	0.0026	2.0421
18	6	50	100	50	0.1431	0.0018	1.2908
3	2	70	200	50	0.1072	0.0023	2.1025
26	4	50	200	50	0.1259	0.0038	2.9962
14	4	70	100	50	0.1258	0.0017	1.3372
6	4	50	300	30	0.0748	0.0017	2.2868
23	4	30	200	70	0.1965	0.0024	1.2066
24	4	70	200	70	0.1978	0.0021	1.0808
1	2	30	200	50	0.1037	0.0029	2.8411
25	4	50	200	50	0.1268	0.0009	0.6875
20	6	50	300	50	0.1225	0.0010	0.8175
8	4	50	300	70	0.1655	0.0019	1.1210

Paso de potencial (A), ancho de pulso (B), Período de pulso (C), Amplitud de pulso (D)

Del estudio de optimización, se obtiene la ecuación que describe la dependencia de la corriente de pico anódico con respecto a las variables propias de la DPV (ecuación 14), siendo el paso de potencial (A), ancho de pulso (B) y período de pulso (C) los factores con un aporte significativo a la señal de respuesta en el modelo teórico.

$$I/mA = 0.0851 + 0.0059 A - 0.00103 B - 0.000239 C + 0.00007 D - 0.00073 A*A + 0.000002 B*B - 0.000000 C*C + 0.000018 D*D - 0.000052 A*B + 0.000010 A*C + 0.000140 A*D + 0.000004 B*C + 0.000007 B*D - 0.000000 C*D$$

Paso de potencial (A), ancho de pulso (B), Período de pulso (C), Amplitud de pulso (D)

Ecuación 15. Modelo polinomial Box-Behnken para la optimización de las variables DPV usando Fe₂O₃-NPs/CPE en solución de glucosa (0.1 mM).

En la figura 3.6 se observa las interacciones de las variables involucradas en la técnica DPV aplicada a la oxidación electroquímica de la Glc empleando el sensor Fe₂O₃-NPs/CPE.

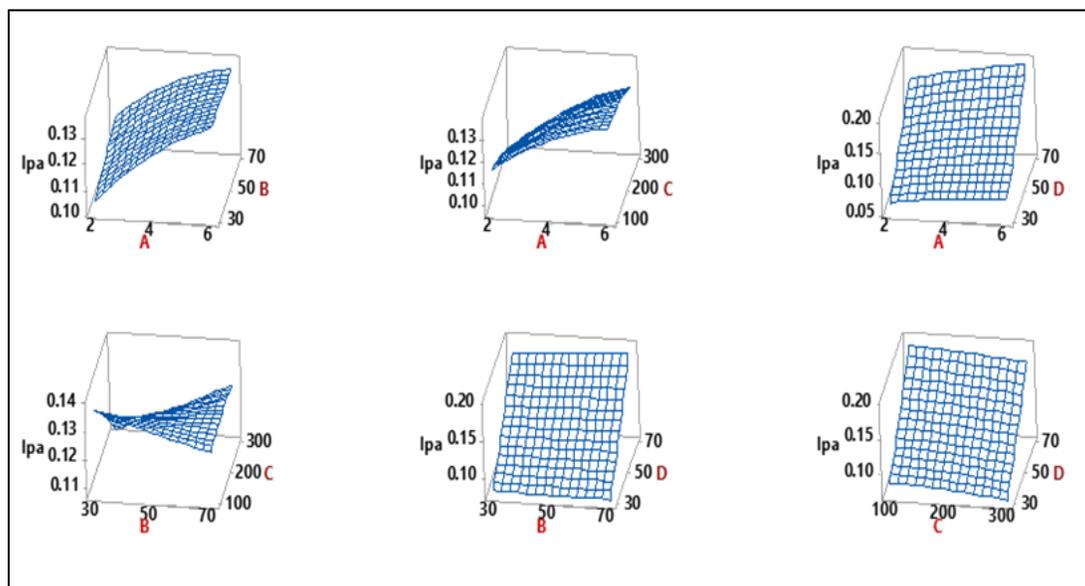


Figura 3.6 Gráfico de superficie de respuesta para la optimización de la señal de respuesta mediante DBB en el proceso de oxidación anódica de la glucosa empleando Fe₂O₃-NPs/CPE. Paso de potencial (A), ancho de pulso (B), Período de pulso (C), Amplitud de pulso (D), Diseño Box-Behnken.

Los parámetros optimizados para la DPV empleando Fe₂O₃-NPs/CPE, se muestran en la tabla 3.2 y se usan para los estudios subsecuentes.

También se obtuvo el valor de error estándar del ruido (S) bajo (0.0105474) y valores de R^2 ajustada (92.59%) y R^2 (96.58%) altos, confirmando un ajuste adecuado de los datos experimentales con el modelo teórico ya que el valor R^2 predicha (80.67%) nos indica que el modelo tiene un porcentaje adecuado para predecir la respuesta en mediciones futuras.

Tabla 3.2 Valores óptimos para los parámetros DPV usando Fe₂O₃-NPs/CPE.

Paso de potencial (A)	Ancho de pulso (B)	Periodo de pulso (C)	Amplitud de pulso (D)
6 mV	30 ms	100 ms	70 mV

La prueba de falta de ajuste del modelo (Lack-of-Fit), nos indica que el valor p (0.146) $>$ α (0.05) a un nivel de confianza del 95%, por lo tanto, se determina con esta prueba que el modelo teórico se ajusta de manera adecuada a los datos.

Para realizar el estudio confirmatorio de la ecuación propuesta en el modelo teórico, se estimó un valor para la corriente anódica teórica de 0.2106 mA, mientras que experimentalmente se obtuvo un valor de 0.1973 mA, lo que confirma el buen ajuste del modelo.

3.1.5 Curva de calibración y parámetros analíticos.

Con los parámetros de DPV optimizados mediante Box-Behnken, se realizó una curva de calibración que presenta un claro aumento en la señal de máxima corriente anódica conforme se aumenta la concentración de Glc. En la figura 3.7 A, se muestra la gráfica de concentración de Glc (μM) vs intensidad de corriente anódica (μA), donde se encuentren tres diferentes zonas de tendencia lineal: 0.3 μM a 1 μM (sensibilidad: 51.579 $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$), 1 μM a 10 μM (sensibilidad: 4.207 $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$) y 30 μM a 700 μM (sensibilidad: 0.0419 $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$) (figura 3.7 B, 3.7 C y 3.7 D respectivamente).

A partir de la curva de calibración se determinaron los parámetros analíticos para la metodología analítica propuesta, los cuales se observan en la tabla 3.3, donde se comparan con otras reportadas en la literatura.

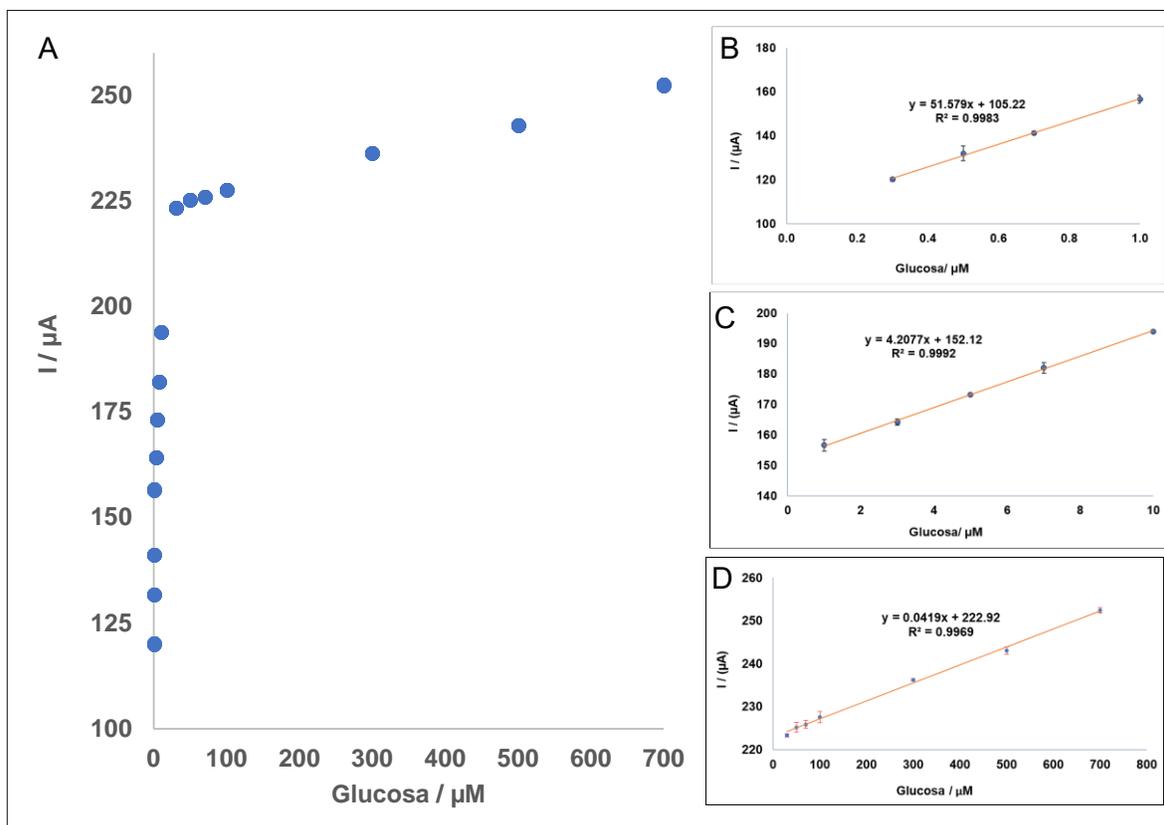


Figura 3.7 Curva de calibración de 10% $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{CPE-NPs}$ para glucosa (medio básico) con parámetros optimizados DPV. Paso potencial de 6 mV, ancho de pulso 30 ms, período de pulso 100 ms, amplitud de pulso de 70 mV

Tabla 3.3 Parámetros analíticos de sensores ferrosos para glucosa.

Sensor	Sensibilidad analítica ($\mu\text{A} \cdot \mu\text{M}^{-1}$)	Rango lineal μM	LOD (μM)	Referencia
Gox/ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}/\text{Pt}$	0.0115 cm^{-2}	6–2200	6	247
Gox/PVA- $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Sn}$	0.0093	5–30000	8	248
Fe_2O_3 nanocable/GCE	0.726	15 – 8000	6	249
Fe_2O_3 -NPs/P4VP-coPAN/GCE	1.382 cm^{-2}	2.5 – 500	0.5	250
FeOOH nanocables	0.012	15 – 3000	7.8	251
Fe_3O_4 nanoesferas	6.560	100–1100	30	252
Ni-Co/ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GCE}$	2.171 cm^{-2}	0.1–1100	0.2	253
Fe_2O_3 -NPs/CPE	51.579	0.15 – 0.1	0.044	Este trabajo
	4.207	0.1 – 100		
	0.0419	300 – 700		

Enzima glucosa oxidasa (Gox), quitosano (CS), alcohol polivinilo (PVA), poli(4-vinilpiridina)-co-poli(acrilonitrilo) (P4VP/coPAN), nanopartículas (NPs), magnetita (Fe_3O_4), electrodo de carbono vítreo (GCE), electrodo de pasta de carbono (CPE).

Al comparar la propuesta Fe₂O₃-NPs/CPE con otras propuestas similares (enzimáticas y no enzimáticas), observamos que presenta el límite de detección (LOD) más bajo, además de un amplio rango lineal de trabajo y valores altos de sensibilidad analítica. Por lo tanto, los parámetros analíticos resultan competitivos en comparación con otras propuestas de sensores basadas en materiales ferrosos.

3.1.6 Repetibilidad, reproducibilidad, estabilidad del sensor y selectividad.

Se prepararon 10 electrodos de manera independiente y se probaron bajo condiciones optimizadas para evaluar la reproducibilidad entre electrodos, empleando una solución de Glc 0.1 mM. La desviación estándar relativa en las mediciones para la prueba de reproducibilidad fue 2.37% (<10%RSD).

El sensor propuesto se almacenó en condiciones ambientales, y se aplicó para el análisis de soluciones de Glc 0.1 mM cada siete días, durante un período de 28 días. La respuesta analítica obtenida con el sensor almacenado demostró que el 97% de la señal de corriente anódica inicial se mantiene en las pruebas, lo que sugiere una buena estabilidad del sensor a largo plazo.

La selectividad del sensor propuesto fue evaluada utilizando diferentes especies químicas que normalmente pueden coexistir con la Glc en muestras fisiológicas. Las pruebas se realizaron en mezclas de Glc 0.1 mM y las especies interferentes en tres niveles de concentración.

- En una mezcla de Glc y el interferente a concentración 0.01 mM, se observó una interferencia insignificante en la señal de respuesta analítica para Glc en presencia de AA (0.16%), cafeína (0.10%) y AU (0.17%).
- Para una mezcla de Glc e interferentes a la misma concentración se observaron valores de error bajos para la señal de respuesta analítica de Glc en presencia de AA (0.28%), cafeína (0.28%) y AU (0.76%).
- Para concentraciones igual a 1.0 mM para cada interferente, el AA, cafeína y AU, causaron una interferencia insignificante a la señal de respuesta de oxidación de la

Glc, ya que los porcentajes de error calculados fueron 0.31%, 0.33% y 0.89%, respectivamente.

Estos resultados muestran que Fe₂O₃-NPs/CPE presenta una excelente selectividad hacia la detección de Glc considerando que los interferentes en muestras fisiológicas están 30 veces por debajo de la concentración de Glc.

La selectividad puede deberse a la coordinación de Fe³⁺ a Glc que ya ha sido reportada en la literatura; esto podría favorecer la interacción de la Glc con los sitios activos en la superficie del electrodo modificado antes de la formación de la especie R-Fe⁴⁺=O y, por lo tanto, favorecer la oxidación de la Glc sobre otras especies electroactivas.^{254,255}

3.1.7 Análisis en muestras reales.

La funcionalidad del sensor fue evaluada en orina humana. Las muestras de orina fueron dopadas con un estándar de Glc, hasta alcanzar una concentración 0.55 mM. Las muestras fueron analizadas por triplicado, empleando la metodología basada en el Fe₂O₃-NPs /CPE y también por vía enzimática (hexoquinasa) con fines comparativos. Los resultados se presentan en la tabla 3.4.

Tabla 3.4 Cuantificación de glucosa en orina humana usando la metodología optimizada con Fe₂O₃-NPs /CPE.

Muestra	DPV	RSD	Recobro	método	RSD	Recobro	<i>t_{exp}</i>	<i>t_{crítica}</i>
	Fe ₂ O ₃ -NPs/CPE (mM)	(%)	(%)	enzimático (mM)	(%)	(%)		
Orina humana 1	0.5521	0.87	100.38	0.5542	0.34	100.76	1.465	4.3
Orina humana 2	0.5650	0.72	102.72	0.562	0.80	102.18	2.433	4.3

Voltamperometría diferencial de barrido (DPV), nanopartículas (NPs), desviación estándar relativa (RSD)

De acuerdo al análisis estadístico, no se observan diferencias significativas en los resultados obtenidos por ambos métodos (prueba *t* de muestras emparejadas, *t_{crítica}*(4.3) > *t_{exp}*), demostrando que la metodología optimizada usando DPV y el Fe₂O₃-NPs /CPE en el presente

trabajo representa una alternativa viable y novedosa para la determinación de Glc en muestras fisiológicas.

3.2 Sensor de pasta de carbono modificado con MOF-MIL 100 manganeso para cuantificar glucosa.

A continuación, se describe la metodología electroquímica desarrollada para cuantificar Glc en medio básico empleando electrodos de pasta de carbono modificados con MOF MIL-100 Mn.

3.2.1 Estudio del sistema electroquímico mediante CV.

En la figura 3.8 se observan los CVs en sentido anódico (velocidad de barrido: 100 mVs^{-1}), aplicados para evaluar el comportamiento de CPE y el 10% MOF MIL-100 Mn/CPE en una solución 0.1 M ABS ajustada a pH 5.5. En el primer barrido anódico (0 V – 1.2 V) utilizando CPE no se observó ninguna respuesta anódica, al invertir el barrido se registró un pico catódico con un potencial de corriente mínima de -0.865 V asociado a la reducción de oxígeno y formación de grupos funcionales (-C = O, -C-OH, -C-COOH, -C = OH⁺ o C-H)²⁴³ sobre la superficie de CPE. Posteriormente, al invertir el barrido, se registró un proceso anódico con un potencial de corriente anódica máxima en -0.320 V que se puede atribuir a la oxidación de los grupos funcionales formados en el barrido de reducción.

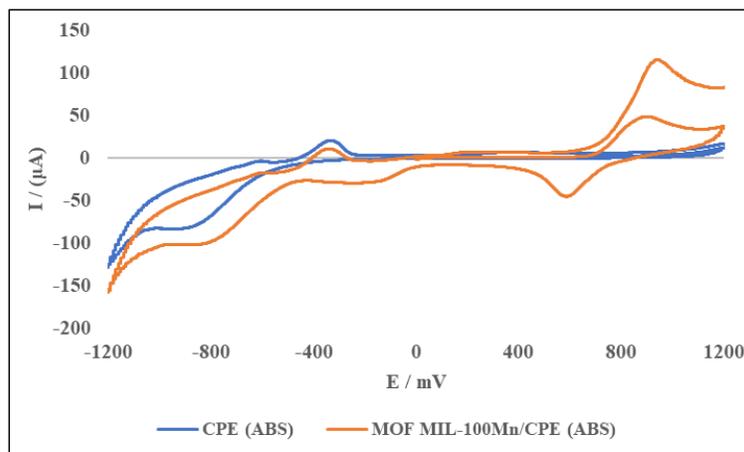


Figura 3.8 CVs obtenidos utilizando CPE y 10% MOF MIL-100 Mn/CPE en ABS 0.1 M (pH 5.5). Velocidad de barrido 100 mVs^{-1} (barrido en sentido anódico). Electrodo de pasta de carbono (CPE), Metal organic-framework (MOF), Material del Instituto Lavoisier (MIL), solución buffer de acetato (ABS).

El CV correspondiente a MOF MIL-100 Mn/CPE (línea naranja) registró un pico anódico en el primer barrido a un potencial de pico de 0.9 V (39.8 μ A) y que se relaciona con el proceso de oxidación de Mn^{3+} (presente en el MOF MIL-100 Mn) a Mn^{4+} [MnO_2],²⁵⁶ y al invertir el sentido de barrido se presenta el proceso catódico relacionado con la reducción de Mn^{4+} a Mn^{3+} , con una corriente mínima registrada a un potencial de 0.595 V. Posteriormente se observa un pico catódico a un potencial de -0.18 V que se atribuye a la reducción de Mn^{3+} a Mn^{2+} [MnO]²⁵⁶ y continuando con el barrido se observa un pico catódico más intenso que el obtenido con CPE, a un potencial mínimo de corriente de pico de -0.815 V que correspondería al proceso de reducción de Mn^{2+} a Mn^0 , simultáneamente con la reducción de oxígeno y formación de grupos funcionales (-C = O, -C-OH, -C-COOH, -C = OH⁺ o C-H)²⁴³ en la superficie del electrodo. Al realizar la segunda exploración anódica, se puede observar un proceso anódico con un potencial de corriente anódica máxima en -0.320 V que se puede atribuir a la oxidación de los grupos funcionales (-C = O, -C-OH, -C-COOH, -C = OH⁺ o C-H)²⁴³ formados en el barrido de reducción y la oxidación de Mn^0 a Mn^{2+} , posteriormente a 250 mV se observa el proceso de oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} y por último la oxidación de Mn^{3+} a Mn^{4+} a un potencial de 0.920 V.

En la figura 3.9, se presentan los CVs en sentido anódico obtenidos con los electrodos de trabajo en presencia de una solución de Glc 1 μ M en ABS a pH 5.5. El CPE presentó un comportamiento similar al registrado en solución ABS. El sensor MOF MIL-100 Mn/CPE, sin embargo, registró un pico anódico en el primer segmento de barrido a un potencial de 0.920 V y con una intensidad de corriente de pico anódico mayor (48.1 μ A) en comparación con la registrada en ausencia de Glc, efecto que podemos relacionar con el proceso de oxidación de la Glc en la superficie del electrodo modificado. En las demás etapas de barrido se observa un comportamiento similar al mostrado en ausencia de Glc.

Se aplicó LSV en sentido anódico para evaluar el comportamiento del electrodo modificado (MOF-MIL-100 Mn/CPE) y uno sin modificar (CPE) en una solución de Glc (1 μ M) en ABS 0.1 M a pH 5.0. En la figura 3.10 se observa que al utilizar el CPE no hay ondas anódicas ni en presencia ni en ausencia de Glc.

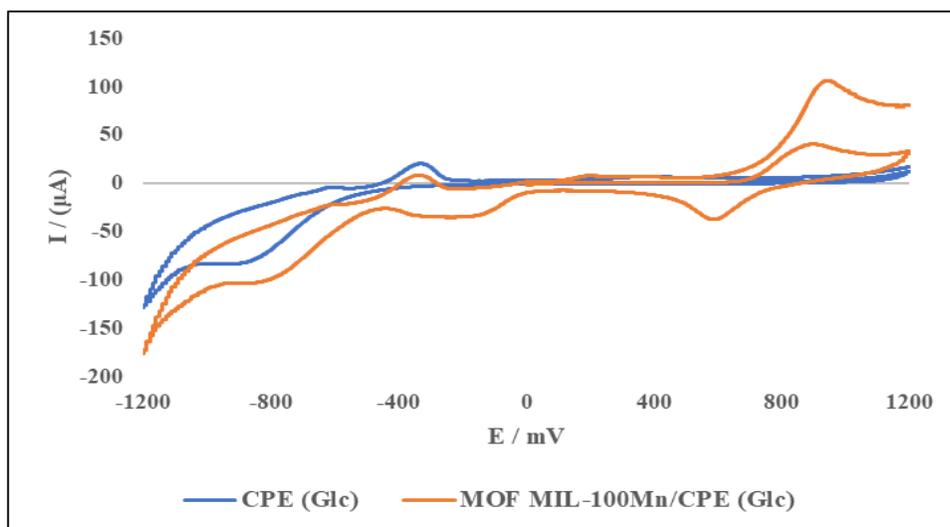


Figura 3.9 CVs obtenidos utilizando CPE y 10% MOF MIL-100 Mn/CPE en 1 μM glucosa (ABS 0,1 M, pH 5.5). Velocidad de barrido 100 mVs^{-1} (barrido en sentido anódico).

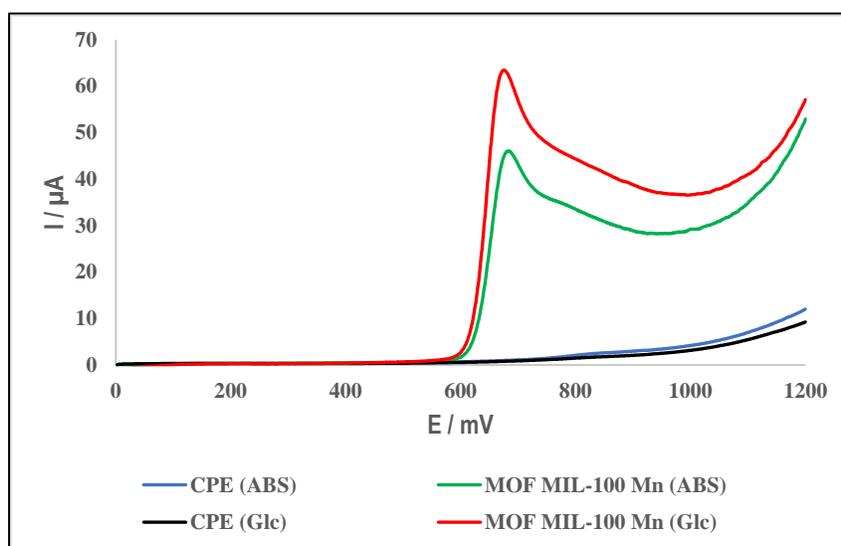


Figura 3.10 LSVs obtenidos utilizando CPE y MOF MIL-100 Mn/CPE en ABS y en Glc (disuelta en 0.1 M ABS, pH 5.5). Velocidad de barrido 100 mVs^{-1} (barrido en sentido anódico), glucosa (Glc).

La LSV obtenido con el electrodo MOF-MIL-100 Mn/CPE aplicado a la solución ABS presentó un potencial de pico anódico aproximadamente en 690 mV con una intensidad de corriente de pico de $45.98 \mu\text{A}$, que se relaciona con el proceso de oxidación de Mn^{3+} (presente en el MOF MIL-100) a Mn^{4+} . Al usar el MOF MIL-100 Mn/CPE en la solución de Glc, se observa un incremento en el valor de la I_{ap} ($62.1 \mu\text{A}$) en comparación con el CPE, lo que se asocia al proceso de oxidación de la Glc en la superficie del electrodo modificado favorecido por la presencia de Mn^{4+} formado a partir de Mn^{3+} (figura 3.11).

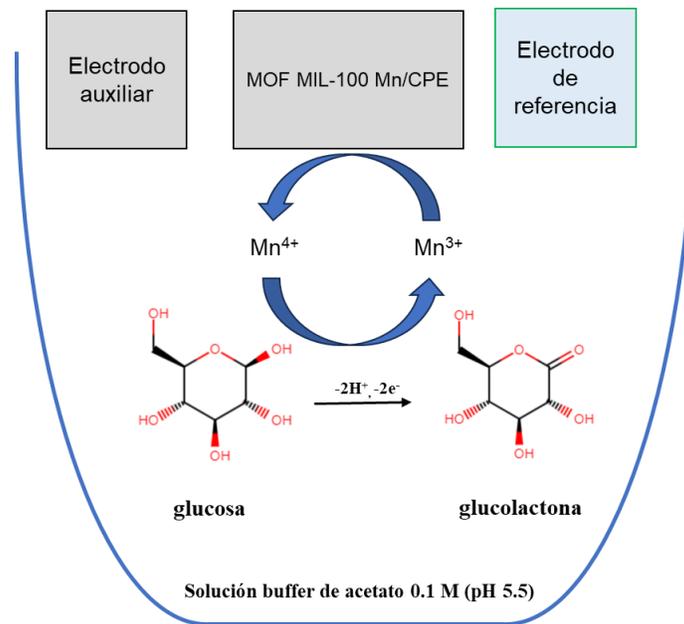


Figura 3.11 Mecanismo de respuesta electroquímica hacia glucosa usando el MOF MIL-100 Mn/CPE.

3.2.2 Optimización del porcentaje de MOF MIL-100 Mn en la mezcla composite del CPE.

El porcentaje de MOF MIL-100 Mn en el sensor modificado fue evaluado y optimizado usando LSV en una solución de Glc $1 \mu M$ disuelta en ABS (pH 5.5). Se probaron porcentajes de 0%, 3%, 5%, 7%, 10%, 13% y 15%, los resultados se muestran en la figura 3.12.

Al comparar la corriente máxima en el proceso de oxidación de Glc en la superficie de MOF MIL-100 Mn/CPE obtenido con las diferentes proporciones, con el 10% de MOF MIL-100 Mn se obtuvo la intensidad de corriente más alta, lo que demuestra que el uso de esta proporción mejora la respuesta anódica.

También, se observa que al aumentar la proporción de MOF MIL-100 Mn en el CPE, la intensidad de corriente anódica disminuye debido a las deficientes propiedades conductoras que posee el MOF, dificultando el paso de corriente en la superficie del electrodo modificado.^{257,258}

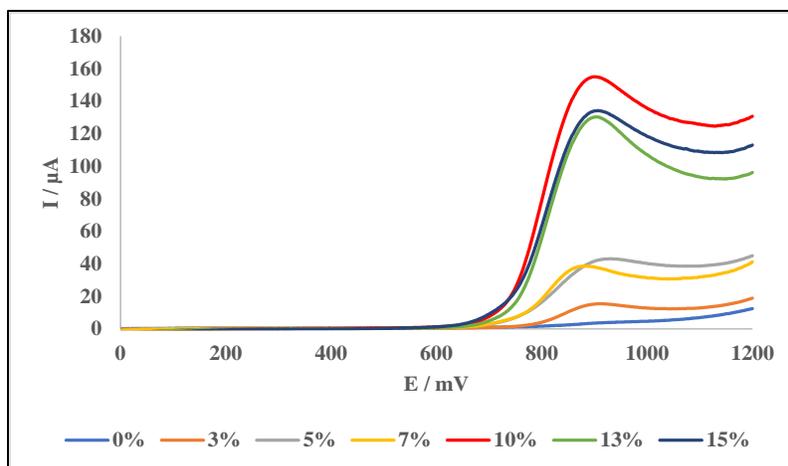


Figura 3.12 Optimización de MOF MIL-100 dentro del CPE usando una solución de $1 \mu\text{M}$ Glc (disuelta en ABS, pH 5.5). Velocidad de barrido 100 mVs^{-1} (barrido en sentido anódico).

De acuerdo con estos resultados, 10% de MOF MIL-100 Mn en la mezcla composite es el valor de porcentaje seleccionado como la proporción optimizada de modificante para experimentos posteriores.

3.2.3 Optimización de pH del electrolito soporte.

El efecto del pH del electrolito soporte sobre la respuesta electroquímica del sensor MOF MIL-100 Mn/CPE hacia la oxidación de la $1 \mu\text{M}$ Glc se investigó usando LSV en un rango de pH de 3.5 a 6.0.

Como se observa en la figura 3.13, usando un pH de 5.5 se obtuvo la intensidad de corriente de pico anódico más alta en un potencial (E_{pa}) de 707 mV aproximadamente, lo que sugiere que el uso de este valor de pH estabiliza la especie Mn^{4+} y lo cual incrementa la señal de respuesta relacionada con la presencia de la Glc en solución. En consecuencia, este valor de pH se considera como el óptimo para el electrolito soporte.

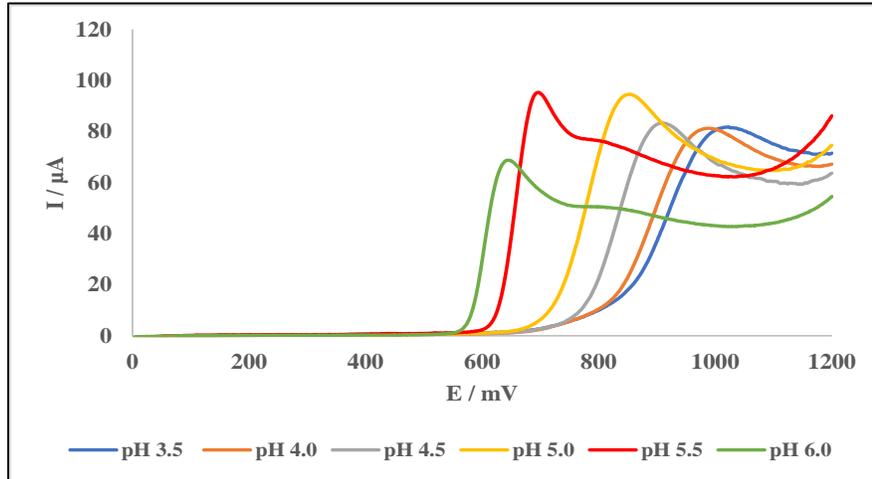


Figura 3.13 Optimización del pH del usando MOF MIL-100 Mn/CPE en 1 μ M de Glc (disuelta en 0.1 M ABS). Velocidad de barrido 100 mVs^{-1} (barrido en sentido anódico)

3.2.4 Optimización de los parámetros DPV.

El diseño Box-Behnken usado para la optimización de los parámetros de la DPV estableció veintisiete experimentos para maximizar la corriente de pico anódico. En la tabla 3.5, se presenta los resultados por triplicado de las mediciones obtenidas para cada experimento. Los experimentos confirmatorios (25, 26 y 27) presentaron %RSD promedio igual a 4.07% (<10% RSD), confirmando la precisión de las mediciones.

A partir del estudio de optimización, se obtiene la ecuación que describe la dependencia de la corriente de pico anódico respecto a las variables de la DPV (ecuación 15), siendo el paso de potencial (A), ancho de pulso (B), período de pulso (C) y amplitud de pulso (D), los factores con una contribución significativa a la señal de respuesta en el modelo teórico.

$$I/\mu\text{A} = -71.5 + 8.9 A + 1.58 B + 0.052 C + 0.82 D - 0.996 A*A - 0.02194 B*B - 0.000698 C*C - 0.00970 D*D - 0.0056 A*B - 0.0050 A*C + 0.0346 A*D + 0.00446 B*C + 0.00492 B*D + 0.00103 C*D$$

Paso de potencial (A), ancho de pulso (B), Período de pulso (C), Amplitud de pulso (D)

Ecuación 16. Modelo polinomial Box-Behnken para la optimización de las variables DPV usando MOF MIL-100 Mn/CPE en solución de glucosa (1 μ M).

Además, el modelo presentó un buen ajuste con los datos experimentales, ya que el valor de error estándar del ruido (S) fue bajo (2.14) y los valores para R^2 (90.58%) y R^2 adjuntada

(89.58%) fueron altos. El valor teórico de corriente de pico anódico se estimó en 53.04 μA , mientras que el valor experimental obtenido fue de 52.96 μA con un valor de desviación estándar relativa (RSD) de 2.72% RSD, confirmando el valor para R^2 predicha (86.15%).

Tabla 3.5 Experimentos para la optimización de DPV usando MOF MIL-100 Mn/CPE.

No. Experimento	A mV	B ms	C ms	D mV	Promedio μA	Desviación estándar	% RSD
16	4	70	300	50	38.81	1.364	3.516
10	6	50	200	30	17.45	0.904	5.183
2	6	30	200	50	14.40	1.249	8.674
21	4	30	200	30	6.76	0.443	6.562
22	4	70	200	30	27.16	0.380	1.400
27	4	50	200	50	40.77	2.309	5.665
19	2	50	300	50	27.33	1.457	5.331
11	2	50	200	70	37.50	0.624	1.665
13	4	30	100	50	23.60	1.136	4.813
12	6	50	200	70	42.33	1.168	2.758
9	2	50	200	30	20.77	0.737	3.549
4	6	70	200	50	44.23	1.680	3.799
15	4	30	300	50	15.73	1.943	12.346
7	4	50	100	70	29.23	1.106	3.784
5	4	50	100	30	25.33	0.643	2.538
17	2	50	100	50	24.20	1.127	4.657
18	6	50	100	50	37.83	0.651	1.720
3	2	70	200	50	42.20	2.138	5.066
26	4	50	200	50	40.60	1.114	2.743
14	4	70	100	50	10.97	0.603	5.496
6	4	50	300	30	26.60	0.100	0.376
23	4	30	200	70	28.67	0.404	1.410
24	4	70	200	70	56.93	0.896	1.574
1	2	30	200	50	11.47	0.486	4.237
25	4	50	200	50	40.03	1.531	3.824
20	6	50	300	50	36.93	1.570	4.250
8	4	50	300	70	38.73	1.002	2.586

Paso de potencial (A), ancho de pulso (B), Período de pulso (C), Amplitud de pulso (D)

Los parámetros optimizados se presentan en la tabla 3.6 y fueron utilizados para la caracterización analítica de la metodología propuesta y estudio de muestras reales.

Tabla 3.6 Valores óptimos para los parámetros DPV usando MOF MIL-100 Mn/CPE.

Paso de potencial (A)	Ancho de pulso (B)	Período de pulso (C)	Amplitud de pulso (D)
5 mV	70 ms	280 ms	70 mV

En la figura 3.14 se observa las interacciones de las variables involucradas en la técnica DPV aplicada a la oxidación electroquímica de la Glc empleando el sensor MOF MIL-100 Mn/CPE.

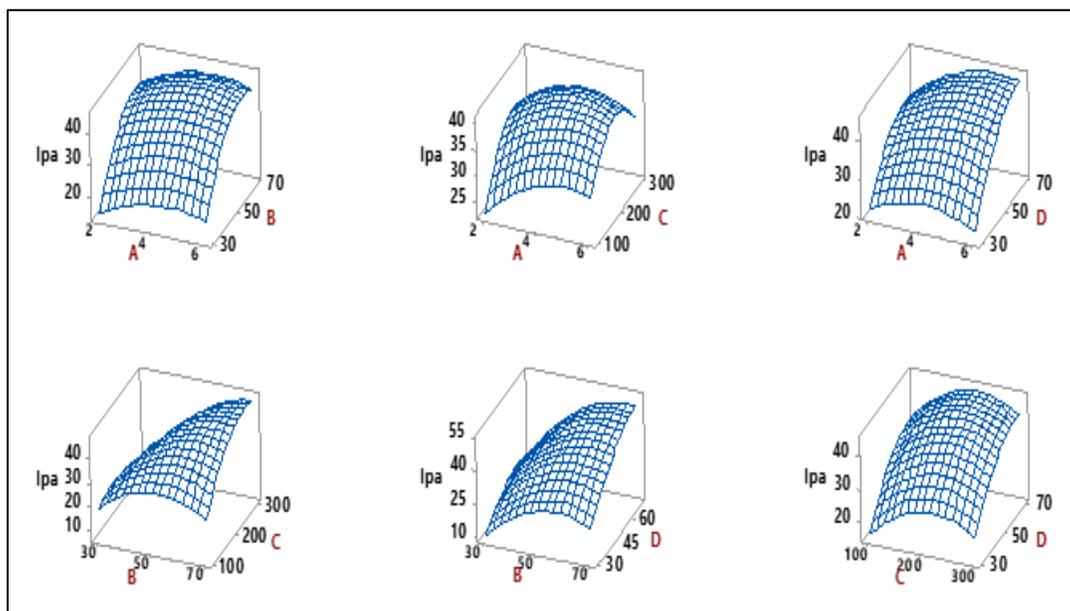


Figura 3.14 Gráfico de superficie de respuesta para la optimización de la señal de respuesta mediante DBB en el proceso de oxidación anódica de la glucosa empleando MOF MIL-100 Mn/CPE. Paso de potencial (A), ancho de pulso (B), Período de pulso (C), Amplitud de pulso (D), Diseño Box-Behnken.

3.2.5 Curva de calibración y parámetros analíticos.

Con la metodología optimizada, se construyó una curva de calibración que presenta una relación lineal entre la corriente máxima de pico anódico y la concentración de Glc. La figura 3.15 muestra la curva de calibración obtenida, donde se observan una zona de comportamiento lineal en el intervalo de concentraciones entre 0.05 μM a 5 μM .

Del análisis estadístico de la curva de calibración se determinaron los parámetros analíticos para la metodología propuesta y se reportan en la tabla 3.7, junto a otros reportados en la literatura.

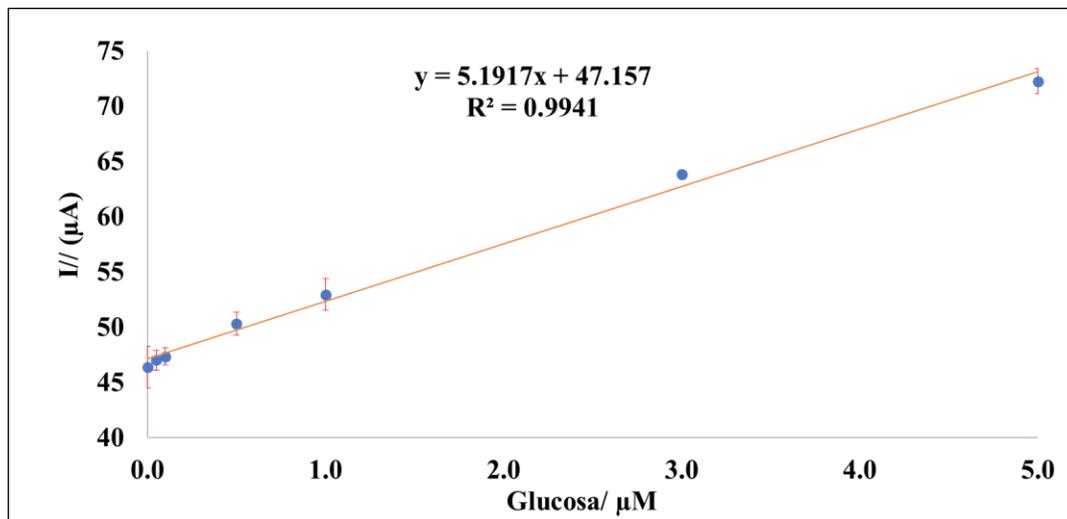


Figura 3.15 Curva de calibración obtenida usando MOF MIL-100 Mn/CPE. Paso potencial de 5 mV, ancho de pulso 70 ms, período de pulso 280 ms, amplitud de pulso de 70 mV.

Al comparar la propuesta MOF MIL-100 Mn/CPE con otras propuestas similares (basadas en MOFs), observamos que presenta el límite de detección (LOD) más bajo y uno de los potenciales anódicos de trabajo más bajos. Por lo tanto, los parámetros analíticos resultan competitivos en comparación con otras propuestas de sensores basadas en materiales MOFs.

Tabla 3.7 Parámetros analíticos de sensores para glucosa basados en MOF.

Electrodo	Medio	mV	LOD μM	Rango lineal μM	Referencia
Ag@TiO ₂ @ZIF-67/GCE	0.1 M NaOH	400	0.99	48-1000	259
Ni-MIL-77/GCE	0.1 M NaOH	600	0.25	1-500	260
Cu-in-ZIF-8/SPCE	0.1 M NaOH	600	2.76	0-700	261
GCE-h-BN-Cu-MOF/NF	0.15 M NaOH	600	5.5	10-900	262
Cu-Co ZIF	0.1 M NaOH	550	2	20-800g	263
MOF MIL-100 Mn/CPE	0.1 M ABS (pH 5.5)	590	0.048	0.05 - 5	Este trabajo

Zeolita Imidazol Frameworks (ZIF), metal orgánico-frameworks (MOF), Material del Instituto Lavoisier (MIL), nanopartículas (NPs), nitruro de boro hexagonal (h-BN), solución buffer de acetatos (ABS), electrodo níquel Foam (NF) Electrodo de carbono vítreo (GCE), electrodo de pasta de carbono (CPE), electrodo serigrafiado (SPCE), Molaridad (M).

3.2.6 Repetibilidad, reproducibilidad, estabilidad y selectividad.

La repetibilidad del sensor se determinó realizando diez mediciones sucesivas utilizando una solución de Glc 1 μM en condiciones optimizadas. Se obtuvo un %RSD de 3.38% (<10% RSD) demostrando la precisión en las mediciones realizadas con MOF MIL-100 Mn/CPE.

Cinco electrodos se construyeron y probaron de forma independiente para evaluar la reproducibilidad entre electrodos, utilizando una solución de Glc 1 μM en condiciones optimizadas. El RSD obtenido después de las mediciones fue de 3.95 % (<10% RSD), demostrando la precisión en las mediciones obtenidas con diferentes electrodos elaborados con pasta de carbono modificada con el MOF MIL-100 Mn.

Los estudios de repetibilidad y reproducibilidad confirman la fiabilidad del método propuesto para la detección de Glc.

La selectividad de MOF MIL-100 Mn/CPE se evaluó utilizando diferentes especies químicas que pueden coexistir con la Glc en muestras reales. Las pruebas se realizaron empleando una solución de Glc 1 μM y tres niveles de concentración de interferentes.

- En una mezcla de Glc y el interferente a concentración 0.01 μM , se observó una interferencia insignificante en la señal de respuesta analítica para Glc en presencia de AU (0.36%), AA (0.70%) y cafeína (0.71%).
- Para una mezcla de Glc e interferentes a la misma concentración se observaron valores de error bajos para la señal de respuesta analítica en presencia de AU (0.95 %), AA (1.96%) y cafeína (1.08 %).
- En una mezcla de Glc 1 μM con el interferente a una concentración 10 μM , se encontraron valores de error relativo de 1.52 %, 3.28% y 1.46% para el AU, AA y cafeína, respectivamente.

La selectividad demostrada en los experimentos anteriores se debe a la interacción del Mn presente en el MOF MIL-100 con Glc, favoreciendo la transferencia de carga entre el oxígeno presente en el carbono 6 de la Glc y el Mn facilitando la oxidación de la Glc en los sitios activos del electrodo modificado con el MOF-MIL-100 Mn.²⁶⁴

3.2.7 Análisis en muestras reales.

Para el análisis de muestras reales se usó orina humana las muestras fueron dopadas hasta alcanzar 4 μM de orina en ABS 0.1 M (pH 5.5). El análisis de las muestras se realizó usando la metodología propuesta y aquella espectrofotométrica basado en hexoquinasa con fines comparativos; los resultados correspondientes se presentan en la tabla 3.8.

Tabla 3.8 Cuantificación de glucosa en orina humana usando MOF MIL-100 Mn/CPE

Muestra	DPV	%RSD	Recobro	Método	%RSD	Recobro	t_{exp}	$t_{critica}$
	MOF MIL- 100 Mn/CPE		(%)	enzimático		(%)		
Orina humana 1	3.98	1.89	99.5	3.90	3.38	97.5	0.16	4.30
Orina humana 2	3.93	0.77	98.5	4.02	3.81	100.5	0.31	4.30

Voltamperometría diferencial de pulso (DPV), Metal Organic-Framework (MOF), Material del Instituto Lavoisier (MIL), Electrodo de Pasta de Carbono (CPE), desviación estándar relativa (RSD).

Se considera una $t_{critica}$ de 4.30 para dos grados de libertad a un nivel de confianza del 95%. Los valores de t_{exp} son inferiores a los valores de t-crítica, por lo que no se observaron diferencias significativas en los resultados obtenidos con ambas metodologías demostrando que la metodología propuesta representa una alternativa para la determinación de Glc en muestras fisiológicas.

3.3 Sensor de pasta de carbono modificado con nanopartículas de Bi_2O_3 para determinar ácido úrico.

A continuación, se describe la metodología electroquímica desarrollada para cuantificar AU empleando electrodos de pasta de carbono modificados con nanopartículas de óxido de bismuto (III).

3.3.1 Estudio del sistema electroquímico mediante CV.

Se utilizó CV en sentido anódico a una velocidad de barrido de 100 mVs^{-1} para evaluar el comportamiento de un CPE y del Bi_2O_3 -NPs/CPE en una solución del electrolito soporte ABS 0.1 M ajustada a pH 5.5 (figura 3.16). En el primer barrido anódico utilizando CPE no

se observó respuesta anódica, al invertir el barrido se registró un pico catódico con un potencial de corriente mínima de -0.69 V asociado a la reducción de oxígeno y formación de grupos funcionales ($-C = O$, $-C-OH$, $-C-COOH$, $-C = OH^+$ o $C-H$)²⁴³ sobre la superficie de CPE. Posteriormente, al invertir el barrido, se registró un proceso anódico con un potencial de corriente anódica máxima en -0.36 V que se puede atribuir a los grupos funcionales ($-C = O$, $-C-OH$, $-C-COOH$, $-C = OH^+$ o $C-H$)²⁴³ formados en el barrido de reducción.

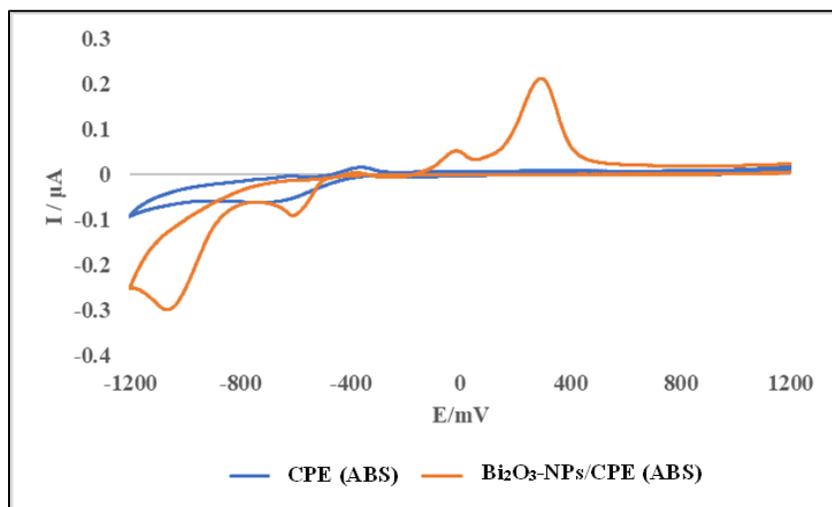


Figura 3.16 CVs obtenidos usando el CPE y 10% Bi_2O_3 -NPs/CPE en ABS 0.1 M (pH 5.5). Velocidad de barrido 100 mVs^{-1} (barrido en sentido anódico).

El voltamperograma correspondiente al Bi_2O_3 -NPs/CPE tampoco registró señales de respuesta anódica en el primer barrido, mientras que al invertir el sentido de barrido se presentó un proceso catódico con una corriente máxima de -0.6 V que se atribuye a la reducción de Bi^{3+} presente en Bi_2O_3 a una especie intermedia BiO_2^{2-} ²⁶⁵ y continuando con el barrido se observa un pico catódico más intenso que el obtenido con CPE, a un potencial de mínima corriente de pico de -1 V que correspondería al proceso de reducción de BiO_2^{2-} a Bi^0 simultáneamente con la reducción de oxígeno y formación de grupos funcionales ($-C = O$, $-C-OH$, $-C-COOH$, $-C = OH^+$ o $C-H$)²⁴³ en la superficie del electrodo. Al realizar la segunda exploración anódica, se puede observar un proceso de oxidación a un potencial de 0 V correspondiente a la oxidación de Bi^0 a la especie intermedia de BiO_2^{2-} y posteriormente la oxidación a Bi^{3+} (presente en Bi_2O_3 -NPs) a un potencial de 0.282 V.

En la figura 3.17, se presentan los CVs obtenidos bajo las mismas condiciones descritas anteriormente en presencia de una solución de AU 0.5 mM disuelta en ABS a pH 5.5. Ambos electrodos presentaron un pico anódico en el primer segmento a un potencial de 0.4 V, que se relaciona con la oxidación de AU. En ninguno de los electrodos se registró algún pico de reducción al invertir el barrido, sugiriendo que la oxidación de AU en CPE y Bi₂O₃-NPs/CPE se realiza mediante un proceso electroquímico/químico. En las demás etapas de barrido se observa un comportamiento similar al mostrado en ausencia de AU para ambos electrodos de trabajo.

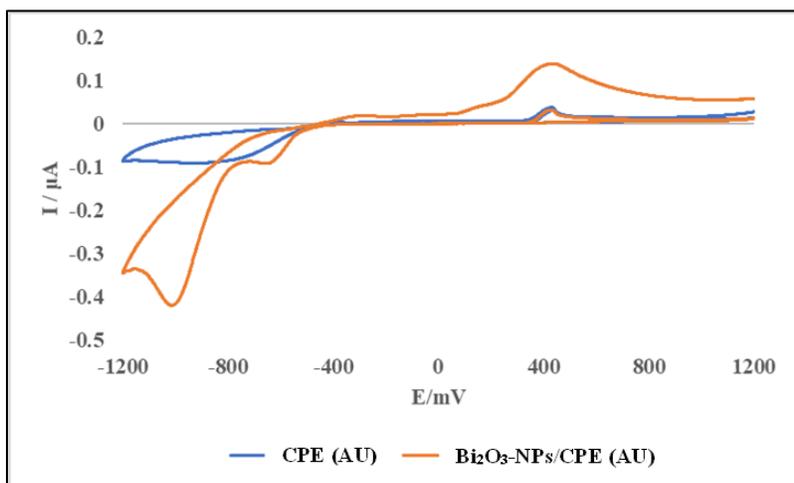


Figura 3.17 CVs obtenidos usando CPE y 10% Bi₂O₃-NPs/CPE en AU 0.5 mM (disuelto en ABS 0.1 M, pH 5.5). Velocidad de barrido 100 mVs⁻¹ (barrido en sentido anódico). Electrodo de pasta de carbono (CPE), nanopartículas (NPs), ácido úrico (AU), solución buffer de acetato (ABS).

Mediante LSV (figura 3.18), se observa que Bi₂O₃-NPs incrementa la intensidad de corriente anódica (I_{ap}) correspondiente al proceso de oxidación de AU sobre la superficie del electrodo de pasta de carbono, en comparación con un CPE sin modificar.

El rendimiento catalítico mejorado que presenta el Bi₂O₃-NPs/CPE, es debido al efecto sinérgico ocasionado por la combinación de las propiedades Bi₂O₃-NPs y las del grafito, facilitando la transferencia de electrones en la superficie del sensor propuesto durante el proceso de oxidación electroquímica de AU.²⁶⁶ Los resultados muestran que la Bi₂O₃-NPs mejoraron la superficie disponible para la transferencia de electrones en el proceso de oxidación de AU.

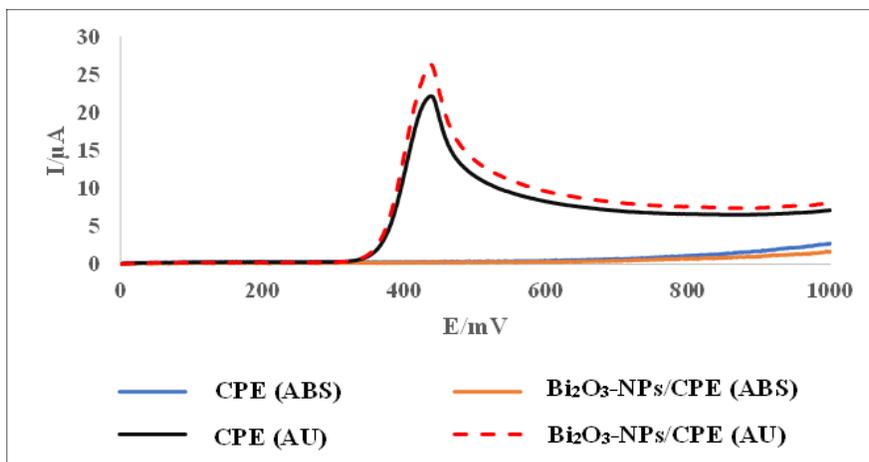


Figura 3.18 LSVs obtenidos con el CPE y el Bi₂O₃-NPs/CPE en ausencia de AU (ABS 0.1 M, pH 5.5.) y 0.5 mM (disuelto en ABS 0.1 M a pH 5.5). Velocidad de barrido 100 mVs⁻¹ (barrido en sentido anódico), electrodo de pasta de carbono (CPE), nanopartículas (NPs), ácido úrico (AU), solución buffer de acetato (ABS).

3.3.2 Optimización del porcentaje de Bi₂O₃-NPs en el CPE.

El porcentaje de Bi₂O₃-NPs en el sensor modificado fue evaluado y optimizado por LSV utilizando una solución de AU 0.5 mM disuelta en ABS a pH 5.5. Se probaron los siguientes porcentajes de nanopartículas en el composite: 0%, 5%, 10%, 15% y 20%, los resultados se presentan en la figura 3.19.

Al comparar la máxima corriente de pico anódico de cada una de las proporciones, con el 10% de Bi₂O₃-NPs se obtuvo la intensidad de corriente más alta, lo que sugiere que el uso de esta proporción mejora la electrocatálisis de la oxidación del AU sin comprometer la conductividad del electrodo. Esto se puede confirmar al observar un desplazamiento del pico de máxima corriente anódica hacia potenciales menos positivos. En consecuencia, este porcentaje fue seleccionada como la proporción óptima de modificante para experimentos posteriores.

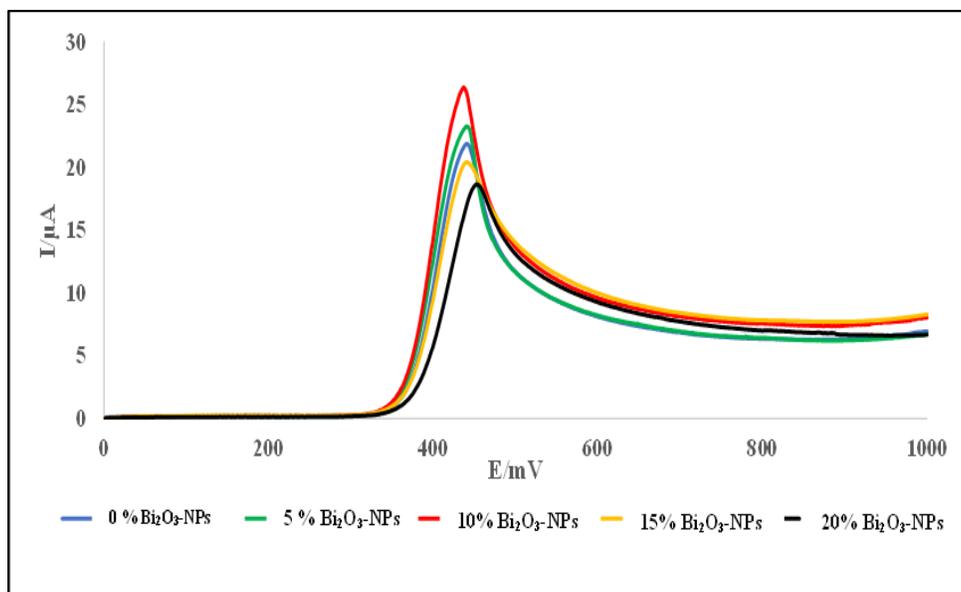


Figura 3.19 LSVs obtenidos al considerar diferentes porcentajes de $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{-NPs}$ en el CPE, en 0.5 mM de AU (disuelto en ABS 0.1 M , pH 5.5). Velocidad de barrido 100 mVs^{-1} (barrido en sentido anódico), electrodo de pasta de carbono (CPE), nanopartículas (NPs), ácido úrico (AU), solución buffer de acetato (ABS).

3.3.3 Optimización de pH del electrolito soporte.

El efecto del pH del electrolito soporte sobre la respuesta electroquímica del sensor $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{-NPs}$ hacia la oxidación del AU se investigó usando LSV en un rango de pH de 4.0 a 7.0. Como se observa en la figura 3.20 A, el pico anódico relacionado con la oxidación de AU depende del pH; al incrementar el valor disminuye el potencial anódico y la intensidad de corriente. Se considera como pH óptimo 5.5 debido a que nos ofrece un valor de intensidad de corriente anódica alta (comparado con valores mayores) y un valor de potencial de pico anódico más bajo en comparación con los obtenidos a valores de pH menores a 5.5.

En la figura 3.20 B, se observa un gráfico de potencial de pico anódico vs pH. Al realizar el análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, la ecuación de la regresión registra una pendiente de $-49.78 \text{ mV/unidad de pH}$, cercano al valor Nerstiano de 59 mV , por lo que se deduce que en el proceso de oxidación electroquímica de AU se requieren dos electrones y dos protones, tal y como lo describe la literatura.²⁶⁷⁻²⁶⁹

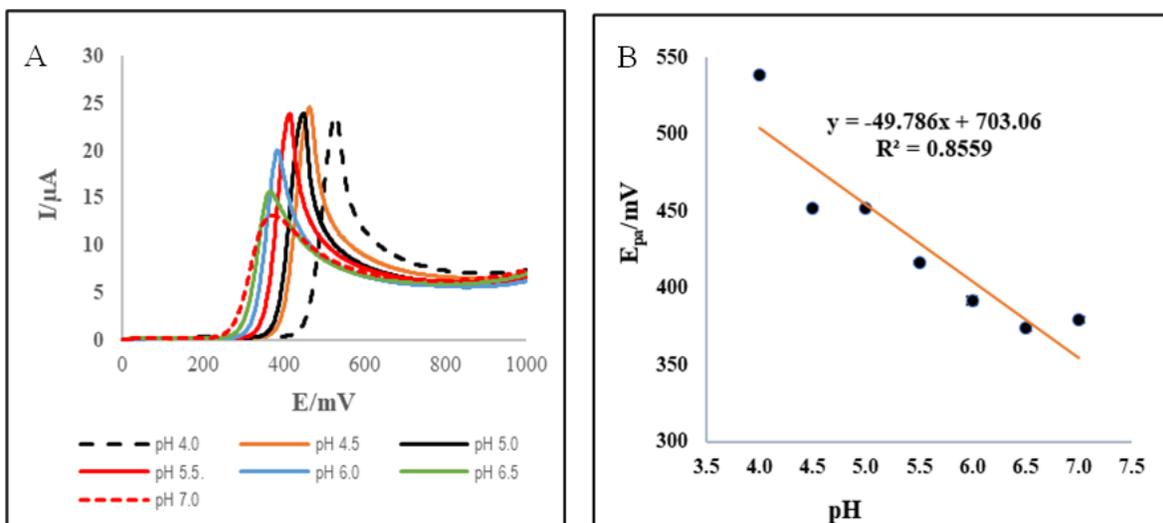
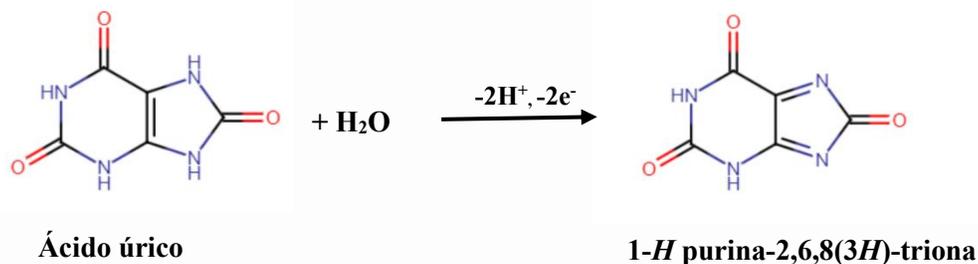


Figura 3.20 A) LSVs registrados a diferentes valores de pH usando el $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{-NPs/CPE}$ en 0.5 mM UA (disuelto en ABS 0.1 M) y B) gráfico de potencial de pico anódico vs pH. Velocidad de barrido 100 mVs^{-1} (barrido en sentido anódico), electrodo de pasta de carbono (CPE), nanopartículas (NPs), ácido úrico (AU), solución buffer de acetato (ABS).

De acuerdo con la literatura²⁷⁰⁻²⁷², el mecanismo de oxidación de AU corresponde al mostrado en la ecuación 16.



Ecuación 17. Mecanismo de oxidación electroquímica no enzimática de ácido úrico.

3.3.4 Optimización de los parámetros de la DPV.

Mediante un diseño Box-Behnken se establecieron veintisiete experimentos con el objetivo de maximizar la corriente anódica en el proceso de oxidación de 0.5 mM AU empleando DPV.

En la tabla 3.9, se representan los resultados obtenidos por triplicado para las mediciones obtenidas en cada experimento, observándose valores de RSD menores a 10% , confirmando la precisión de las mediciones. Los experimentos confirmatorios dieron como resultados un

porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD) de 0.96% (<10% RSD) confirmando la precisión de las mediciones.

A partir del estudio de optimización, se obtiene la ecuación que describe la dependencia de la corriente de pico anódico respecto a las variables de DPV (ecuación 17), siendo el paso de potencial (A), ancho de pulso (B), período de pulso (C) y amplitud de pulso (D) los factores con una contribución significativa a la señal de respuesta en el modelo teórico.

$$I / \mu A = -52.0 + 1.73 A + 1.163 B + 0.024 C + 2.025 D - 0.282 A*A - 0.00031 B*B + 0.000153 C*C - 0.00814 D*D - 0.0356 A*B + 0.0031 A*C + 0.0726 A*D - 0.00330 B*C - 0.01506 B*D + 0.00074 C*D$$

Paso de potencial (A), ancho de pulso (B), Período de pulso (C), Amplitud de pulso (D)

Ecuación 18. Modelo polinomial Box-Behnken para la optimización de las variables DPV usando Bi₂O₃-NPs/CPE en solución de ácido úrico (0.5 mM).

Se obtuvo un buen ajuste de los datos experimentales con el modelo teórico, ya que el valor de error estándar del ruido (S) es bajo (5.00074), además de los valores de R² (94.81%) y R² ajustado (88.76%). El valor de R² predictiva (80.14%), demuestra que el modelo tiene un porcentaje adecuado para predecir la respuesta de salida en mediciones futuras.

El valor teórico de corriente de pico anódico se estimó en 89.73 μA, mientras que el valor experimental obtenido fue de 84.72 μA, confirmando el buen ajuste del modelo.

Los parámetros optimizados se presentan en la tabla 3.10, y fueron utilizados para la caracterización analítica de la metodología propuesta y estudio de muestras reales.

En la figura 3.21 se observa las interacciones de las variables involucradas en la técnica DPV aplicada a la oxidación electroquímica del AU empleando el sensor Bi₂O₃-NPs/CPE.

Tabla 3.9 Experimentos para la optimización de DPV usando Bi₂O₃-NPs/CPE.

No. Experimento	A mV	B ms	C ms	D mV	Promedio μ A	Desviación estándar	% RSD
16	4	70	300	50	30.1060	0.43510092	1.44522833
10	6	50	200	30	24.0920	0.22175669	0.92045779
2	6	30	200	50	63.2090	0.68831103	1.08894466
21	4	30	200	30	27.3249	0.62624444	2.29184812
22	4	70	200	30	22.1296	0.48843098	2.20713544
27	4	50	200	50	46.0728	0.54525224	1.18345802
19	2	50	300	50	36.6135	0.45810148	1.2511819
11	2	50	200	70	48.8299	0.69033138	1.41374727
13	4	30	100	50	46.9998	1.09057549	2.32038325
12	6	50	200	70	61.2904	0.30222912	0.49311004
9	2	50	200	30	23.2425	0.21834332	0.93941272
4	6	70	200	50	35.9909	1.26193671	3.5062628
15	4	30	300	50	52.4483	0.49527878	0.94431808
7	4	50	100	70	63.6596	1.39183827	2.18637494
5	4	50	100	30	28.9169	0.77954564	2.69581642
17	2	50	100	50	47.9856	1.3684187	2.85172979
18	6	50	100	50	57.6618	1.07544219	1.86508606
3	2	70	200	50	33.0653	0.56734144	1.71582124
26	4	50	200	50	46.9683	0.4873619	1.03764081
14	4	70	100	50	51.0400	1.11249841	2.17965989
6	4	50	300	30	25.8342	0.34869532	1.3497413
23	4	30	200	70	77.8820	1.58841627	2.03951566
24	4	70	200	70	48.5959	0.71716212	1.47576673
1	2	30	200	50	54.5876	1.16098528	2.12682839
25	4	50	200	50	46.0344	0.31001383	0.673439
20	6	50	300	50	48.7922	0.94907045	1.94512607
8	4	50	300	70	66.5182	0.60435706	0.9085594

Paso de potencial (A), ancho de pulso (B), Período de pulso (C), Amplitud de pulso (D)

Tabla 3.10 Valores óptimos para los parámetros DPV usando Bi₂O₃-NPs/CPE.

Paso de potencial (A)	Ancho de pulso (B)	Periodo de pulso (C)	Amplitud de pulso (D)
6 mV	30 ms	100 ms	70 mV

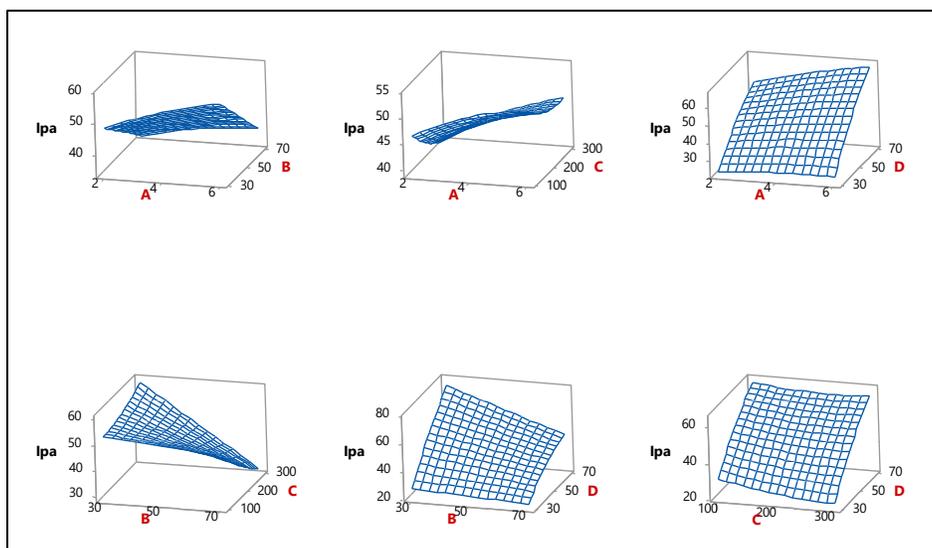


Figura 3.21 Gráfico de superficie de respuesta para la optimización de la señal de respuesta mediante DBB en el proceso de oxidación anódica de la Glc empleando Bi_2O_3 -NPs/CPE. Paso de potencial (A), ancho de pulso (B), Período de pulso (C), Amplitud de pulso (D), Diseño Box-Behnken.

3.3.5 Determinación de los parámetros analíticos de la metodología optimizada.

Con la metodología optimizada, se construyó una curva de calibración que se muestra en la figura 3.22, donde se observa una relación entre la concentración de AU vs la intensidad de corriente anódica (μA) con dos zonas de tendencia lineal diferentes: de $5 \mu\text{M}$ a $250 \mu\text{M}$ (figura 3.22 B) y de $250 \mu\text{M}$ a $1000 \mu\text{M}$ (figura 3.22 C).

Al comparar la sensibilidad, LOD e intervalos lineales de la propuesta usando Bi_2O_3 -NPs/CPE con otros trabajos similares (tabla 3.11), se observa un amplio rango de concentración lineal, altos valores de sensibilidad y un potencial de oxidación bajo, por lo tanto, los parámetros analíticos obtenidos con la propuesta son competitivos en comparación con otros sensores basados en nanoestructuras de óxidos metálicos y en nanopartículas de bismuto.

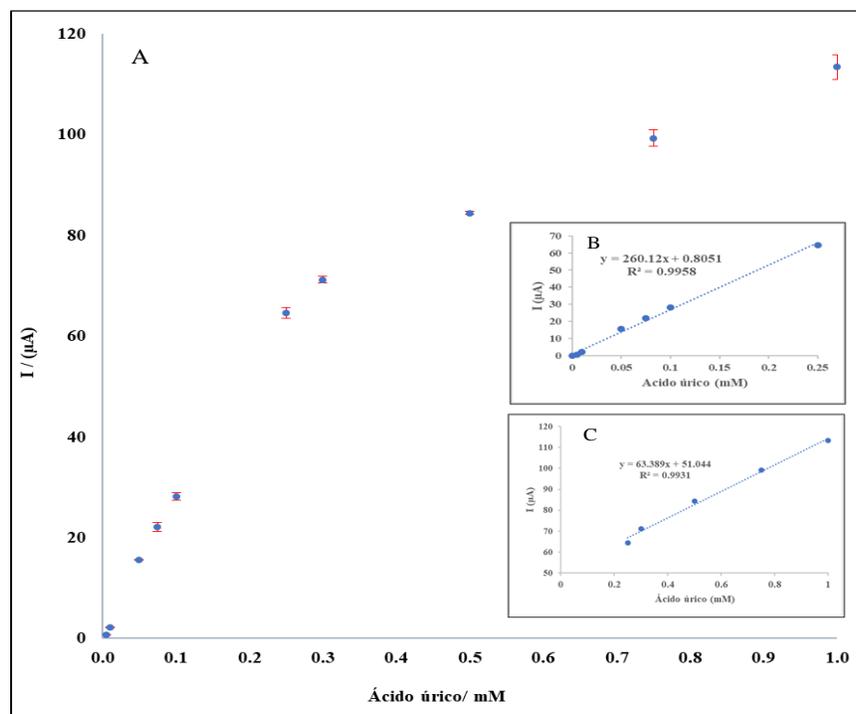


Figura 3.22 Curva de calibración obtenida usando la metodología optimizada para determinar AU. Mediciones obtenidas por DPV (Paso potencial de 6 mV, ancho de pulso 30 ms, período de pulso 100 ms, amplitud de pulso de 70 mV).

Tabla 3.11 Parámetros analíticos de sensores para AU basados en óxidos metálicos.

Composición electrodo	Técnica	mV	pH	Sensibilidad ($\mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1}$)	Rango lineal (μM)	LOD (μM)	Referencia
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -NPs/GCE	DPV	400	7.4	---	0.6 – 15	---	273
ZnO-NPs/GCE	SWV	400	7.4	---	0.2 – 150	0.11	274
NiO/rGO/GCE	DPV	450	4.7	0.27; 0.07	2 – 20; 20 – 120	0.14	275
$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PanNTs/GCE	DPV	---	7.0	0.43	0.01- 5.0	0.03	276
ZnO-CuxO/PPy/GCE	DPV	580	4.0	0.33	0.5 – 70	0.2	277
Bi@C-PTCA/GCE	DPV	450	4.0	0.05	0.1 – 119.1	0.03	278
CuBi ₂ O ₄ film	CV	600	---	206.7 cm ⁻²	10 - 500	1.23	279
Bi ₂ O ₃ -NPs/CPE	DPV	350	5.5	260.12; 63.38	5 - 250 250 - 1000	3.1	Este trabajo

Voltamperometría diferencial de pulso (DPV), voltamperometría de onda cuadrada (SWV), voltametría cíclica (CV), electrodo de pasta de carbono (CPE), metal orgánico-frameworks (MOF), nanopartículas (NPs), óxido de grafeno reducido (rGO), nanotubos polivinilina (PanNTs), polipirrol (PPy), ácido perilentetracarboxílico (PTCA), Molaridad (M).

3.3.6 Repetibilidad, reproducibilidad, estabilidad y selectividad.

La repetibilidad se determinó realizando diez mediciones sucesivas de un sensor en una solución de AU 0.5 mM bajo las condiciones optimizadas. Se obtuvo un %RSD de 1.08% (<10% RSD). Para el estudio de reproducibilidad se prepararon diez electrodos y probaron de forma independiente, utilizando una solución de AU 0.5 mM en las condiciones optimizadas. El RSD obtenido después de las mediciones fue de 1.42 % (<10% RSD).

Los resultados obtenidos para la repetibilidad y reproducibilidad de la metodología optimizada confirman su fiabilidad para la determinación de AU.

El sensor propuesto se almacenó en condiciones ambientales y se utilizó para analizar soluciones de AU 0.5 mM cada siete días por 30 días. La respuesta analítica obtenida con el sensor almacenado mostró que el 97% de la señal de corriente anódica inicial se mantiene, lo que sugiere una buena estabilidad del sensor a largo plazo.

La selectividad del sensor propuesto se evaluó utilizando diferentes especies químicas que generalmente pueden coexistir con el AU en muestras fisiológicas. Las pruebas se realizaron utilizando una solución de AU 0.5 mM y tres niveles de concentración de interferentes:

- En una mezcla de AU y el interferente a concentración 0.05 mM, se observó una interferencia insignificante en la señal de respuesta analítica para AU en presencia de Glc (1.56%), cafeína (0.77%), AA (2.93%), PAR (2.95%) y AO (0.78%).
- Para una mezcla de AU e interferentes a la misma concentración se observaron valores de error bajos para la señal de respuesta analítica del AU en presencia de Glc (0.7%), cafeína (2.29%), AA (2.35%), PAR (0.7%) y AO (1.22%).
- Al emplear una concentración diez veces mayor que la concentración de AU, los errores relativos de la señal de respuesta fueron: 4.67%, 4.86%, 100%, 13.51% y 16.05% para la Glc, cafeína, AA, PAR y AO, respectivamente.

Estos resultados muestran que Bi₂O₃-NPs/CPE presenta una excelente selectividad hacia la detección de AU en presencia de los interferentes en concentraciones diez veces menor o

igual.²⁸⁰ Sin embargo, observamos errores relativos significativos a concentraciones mayores para el AA, PAR y AO, debido a los potenciales anódicos registrados que resultaron ser similares al de AU.

3.3.7 Análisis en muestras reales.

La funcionalidad del sensor propuesto se evaluó en dos muestras de orina humana diluidas (1 mL de orina se disolvió con ABS en un matraz aforado con capacidad de 10 mL) analizadas por triplicado utilizando la metodología optimizada propuesta. Para comparar los resultados, las muestras fueron analizadas por el método enzimático (enzima uricasa). Los resultados correspondientes se presentan en la tabla 3.12, una t crítica de 4.3 se considera para dos grados de libertad (nivel de confianza de 95%).

Los valores experimentales de t son inferiores al valor de t crítica, por lo que no existen diferencias significativas en los resultados obtenidos con ambas metodologías, demostrando que el método propuesto representa una alternativa para cuantificar AU en muestras fisiológicas.

Tabla 3.12 Cuantificación de ácido úrico en orina humana usando $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{-NPs/CPE}$

Muestras	DPV $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{-NPs/CPE}$ (mM)	% RSD	Método uricasa (mM)	% RSD	t_{exp}	$t_{crítica}$
Orina humana 1	1.551	4.21	1.546	1.61	0.027	4.3
Orina humana 2	2.939	3.47	2.914	2.75	1.64	4.3

Voltamperometría diferencial de pulso (DPV), electrodo de pasta de carbono (CPE), desviación estándar relativa (RSD), milimolar (mM), valor de t experimental (t_{exp}).

3.4 Red neuronal artificial para la cuantificación de ácido úrico en presencia de ácido ascórbico, paracetamol y ácido oxálico.

A continuación se describen los resultados obtenidos en la implementación de una red neuronal artificial para la cuantificación de AU en presencia de interferente empleando el sensor $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{-NPs/CPE}$ y las condiciones optimizadas para su uso en muestras de orina humana.

3.4.1 Mediciones electroquímicas del AU en presencia de los interferentes.

En la figura 3.21, se representan los DPVs individuales obtenidos con el $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{-NPs/CPE}$ en una solución 0.1 mM de AO ($E_{\text{pa}}=100$ mV), 0.1 mM AA ($E_{\text{pa}}=280$ mV), 0.1 mM AU ($E_{\text{pa}}=378$ mV), y 0.1 mM PAR ($E_{\text{pa}}=474$ mV). Se observa traslape entre los picos anódicos de las tres moléculas respecto a la del AU, que demuestran su potencial interferencia en la señal analítica al usar el sensor.

3.4.2 Etapa de entrenamiento y prueba mediante la Red Neuronal artificial.

En las figuras 3.22A y 3.22B se presentan los voltamperogramas empleados para la etapa de entrenamiento y etapa de prueba de la RNA, como se describieron en la sección del marco metodológico. Es posible observar que el pico anódico asociado a la oxidación de AU presenta superposición con las señales de respuesta de PAR, AA y AO.

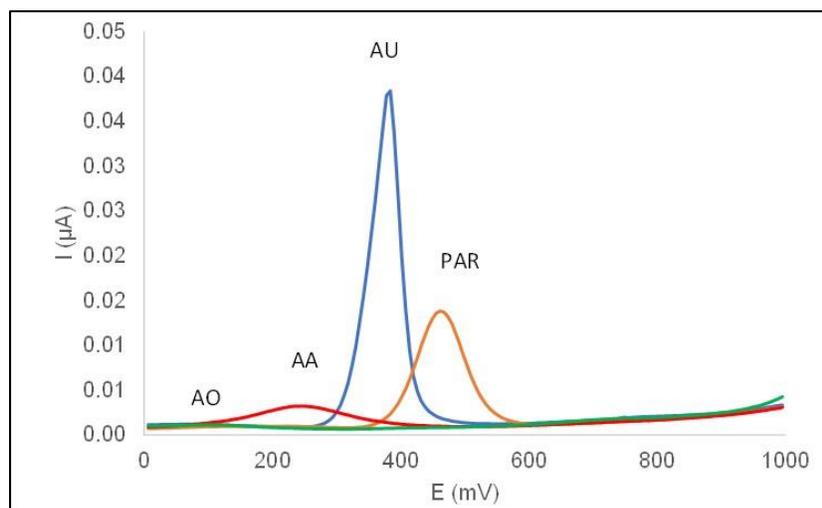


Figura 3.23 DPVs de mezclas 0.1 mM AO, 0.1 mM AA, 0.1 mM AU y 0.1 mM PAR usando 10% $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{-NPs/CPE}$. Empleando 0.1 M ABS (pH 5.5) como medio electrolítico y condiciones optimizadas para DPV (Paso potencial de 6 mV, ancho de pulso 30 ms, período de pulso 100 ms, amplitud de pulso de 70 mV), ácido oxálico (AO), ácido ascórbico (AA), ácido úrico (AU) y paracetamol (PAR).

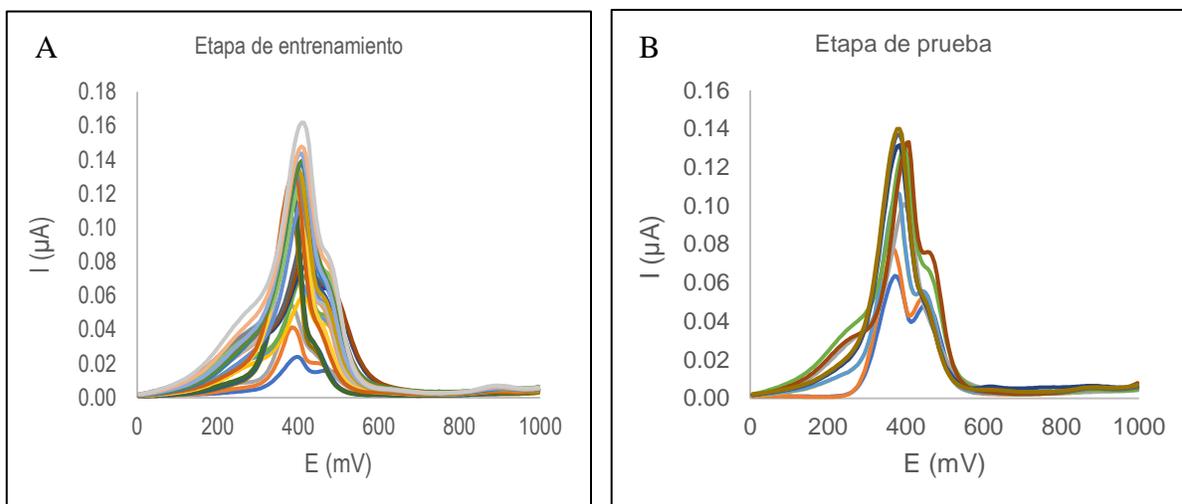


Figura 3.24 DPVs obtenidos para las etapas de A) entrenamiento y B) prueba de la RNA. Empleando 0.1 M ABS (pH 5.5) como medio electrolítico y condiciones optimizadas para DPV (Paso potencial de 6 mV, ancho de pulso 30 ms, período de pulso 100 ms, amplitud de pulso 70 mV).

Usando la programación del perceptrón con una capa oculta y estableciendo un proceso de prueba y error, y una función de entrenamiento mediante una función Levenberg-Marquardt, se determinó una tasa de aprendizaje de 0.25, un impulso de 0.1, un error de 0.01. Se logró maximizar el valor del coeficiente de correlación múltiple (R) y minimizar el valor de EMC para la señal de AU en presencia de los interferentes. El mejor número de neuronas resultó ser ocho, que permitió maximizar el valor de R (figura 3.23 A y 3.23 B) y minimizar el valor de EMC (figura 3.24 A y 3.24 B).

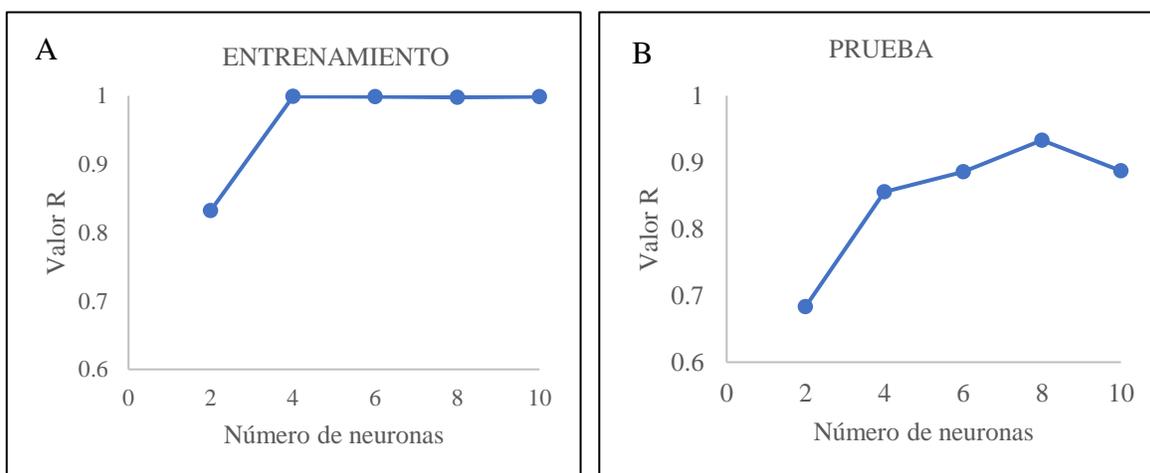


Figura 3.25 Valor de coeficiente de correlación múltiple (R) en la etapa de entrenamiento (A) y etapa de prueba (B) de la RNA.

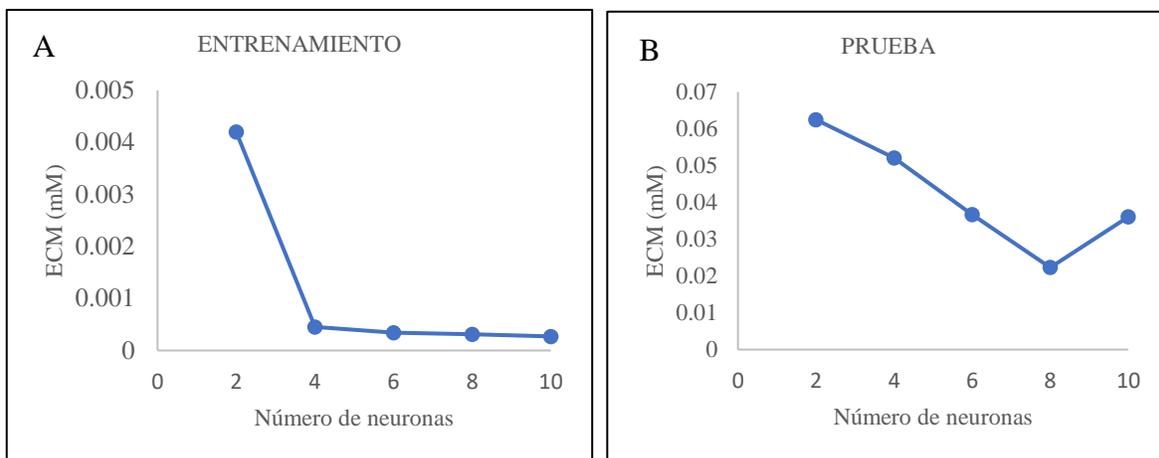


Figura 3.26 Valor del error mínimo cuadrado (EMC) en la etapa de entrenamiento (A) y etapa de prueba (B) de la RNA.

Se determinó el rendimiento de la RNA para el análisis cuantitativo de AU en presencia de los interferentes, mediante la relación estadística entre las concentraciones obtenidas y esperadas para la fase de entrenamiento (figura 3.25 A) y de prueba (figura 3.25 B). Se empleó el estadístico Chi-cuadrado (χ^2) para evaluar la bondad de ajuste de los datos obtenidos y los datos esperados en la RNA; en la etapa de entrenamiento se comprobó $\chi^2_{calculada}$ (0.046) < $\chi^2_{crítica}$ (38.9) y en la etapa de prueba $\chi^2_{calculada}$ (0.0061) < $\chi^2_{crítica}$ (16.92), ambas con un nivel de significación de $\alpha = 0.05$. En ambas etapas $\chi^2_{calculada} < \chi^2_{crítica}$, debido al buen ajuste de los obtenidos por la RNA a la distribución de los datos esperados, por lo tanto, no se presentan diferencias estadísticamente significativas.

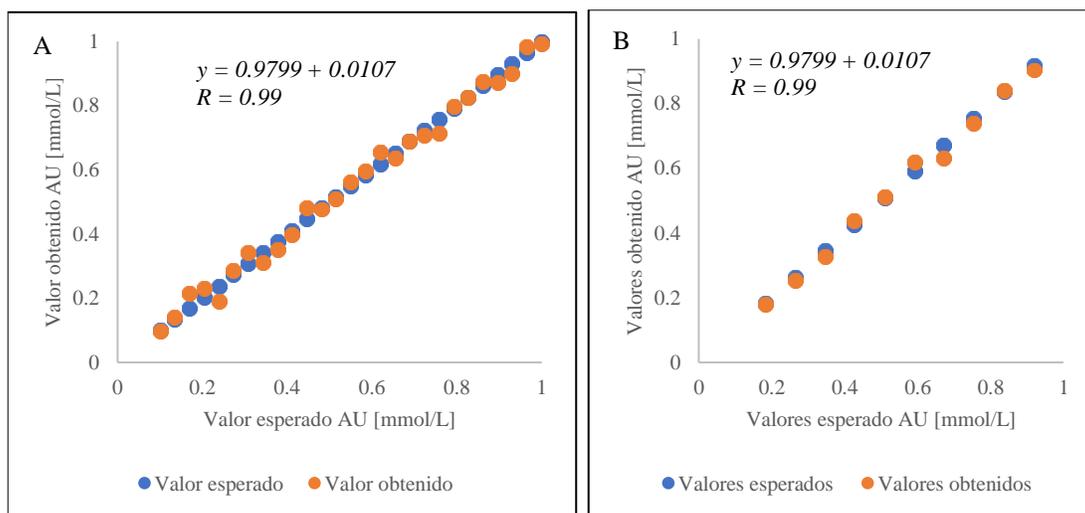


Figura 3.27 Valor de coeficiente de correlación múltiple (R) en la etapa de entrenamiento (A) y etapa de prueba (B) de la RNA para el ácido úrico (AU).

En la tabla 3.13 se resumen los datos de rendimiento de la RNA, el valor de R obtenido para la etapa de entrenamiento (R=0.99) y prueba (R=0.99), indican que la RNA presentó un buen rendimiento para la cuantificación de AU en presencia de interferentes. Además, el valor de PR fue cercano al 100% en ambas etapas, confirmando la capacidad de predicción cuantitativa de la RNA aplicada.

Tabla 3.13 Rendimiento de RNA para cuantificar ácido úrico en presencia de interferentes.

Valor	Entrenamiento	Prueba
Ecuación	$y = 0.9799 + 0.0107$	$y = 0.9904 + 0.0003$
R	0.99	0.99
PR	100.87%	98.85%
EMC	0.000175	0.01387
Validación cruzada	R = 0.9982 (validación 1)	R = 0.9481 (validación 1)
	R = 0.9986 (validación 2)	R = 0.8025 (validación 2)
	R = 0.9965 (validación 3)	R = 0.9506 (validación 3)
	R = 0.9981 (validación 4)	R = 0.9387 (validación 4)

Voltamperometría diferencial de pulso (DPV), red neuronal artificial (RNA), desviación estándar relativa (RSD), coeficiente de correlación múltiple, error medio cuadrático (EMC), porcentaje de recobro (PR).

En la prueba de validación cruzada, los valores de R fueron superiores a 0.90 en tres subconjuntos (1, 3 y 4) para la etapa de entrenamiento y prueba, sin embargo, para el subconjunto 2 el valor de R fue menor a 0.90 en la etapa de prueba.

En la tabla 3.14 se muestra la concentración de AU en muestras de orina humana diluidas (1 mL de orina se disolvió con ABS en un matraz aforado con capacidad de 10 mL) usando la metodología RNA-DPV y la espectrofotométrica enzimática. Una $t_{crítica}$ de 4.3 se considera para dos grados de libertad (nivel de confianza de 95%). Se observa que los datos obtenidos por ambos métodos no presentaron diferencias significativas.

Tabla 3.14 Cuantificación de AU en orina humana usando la RNA-DVP (Bi_2O_3 -NPs/CPE).

Muestras	RNA-DPV (Bi_2O_3 -NPs/CPE) (mM)	% RSD	Método uricasa (mM)	% RSD	t_{exp}	$t_{crítica}$
Orina humana 1	0.3846	3.74	0.3748	3.82	0.072	4.3
Orina humana 2	0.4955	2.98	0.4803	3.11	0.087	4.3

Voltamperometría diferencial de pulso (DPV), electrodo de pasta de carbono (CPE), desviación estándar relativa (RSD), milimolar (mM), valor de t experimental (t_{exp}).

Conclusiones.

En este trabajo de investigación doctoral se desarrollaron metodologías voltamperométricas para la detección de glucosa y ácido úrico basada en sensores no enzimáticos modificados con nanopartículas de óxido de hierro (III), MOF MIL-100 Mn y nanopartículas de óxido de bismuto (III).

En cada una de las metodologías, inicialmente se empleó la optimización univariable para el valor de pH de la solución electrolítica y el porcentaje de modificante en la pasta de carbono, posteriormente, se aplicó el diseño de Experimentos Box-Behnken que permitió maximizar la intensidad de corriente de pico anódico en el proceso de oxidación de los analitos en la superficie del electrodo de pasta de carbono modificando mejorando los parámetros analíticos superando los reportados por propuestas similares.

La primera metodología voltamperométrica desarrollada empleó el sensor $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-NPs/CPE}$ que presentó capacidad electrocatalítica para oxidar a la glucosa en medio básico con un amplio rango lineal de trabajo y con valores de sensibilidad analítica alta y LOD bajo en comparación con propuestas basadas en nanoestructuras de hierro aplicados a la cuantificación de la glucosa.

La segunda metodología fue desarrollada empleando al MOF MIL-100 Mn/CPE para la oxidación electroquímica de la glucosa disuelta en solución buffer de acetato a pH 5.5. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios considerando su LOD bajo y principalmente el valor del pH del medio de trabajo que es más cercano al valor fisiológico en comparación con los valores reportados por la mayoría de las propuestas basadas en nanopartículas de óxidos metálicos o MOFs. Además, esta propuesta representa una alternativa novedosa ya que no encontramos reportes del uso del MOF MIL-100 Mn para desarrollar sensores no enzimáticos funcionales para la cuantificación de los niveles de glicemia.

La tercera metodología fue desarrollada para cuantificar ácido úrico usando el sensor $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{-NPs/CPE}$ que mostró capacidad electrocatalítica para oxidar al ácido un amplio rango de

trabajo y con valores de sensibilidad analítica superiores a propuestas basadas en nanoestructuras de óxidos metálicos. Actualmente, no contamos con evidencia del uso de las Bi₂O₃-NPs en la detección electroquímica de los niveles de uricemia, por lo tanto, el desarrollo de esta metodología voltamperométrica resulta inédita.

Por último, se implementó una red neuronal artificial mediante el modelo perceptrón multicapas para la cuantificación de ácido úrico en presencia de interferentes (ácido oxálico, ácido ascórbico y paracetamol). La optimización exitosa de los parámetros de la etapa de aprendizaje y prueba de la RNA permitieron la cuantificación del ácido úrico en muestras de orina humana dopada con diferentes niveles de concentración de los interferentes.

Todas las metodologías desarrolladas en la presente investigación fueron evaluadas satisfactoriamente en muestras de orina humana y los resultados no presentaron diferencias significativas al ser comparadas con los obtenidos por ensayos enzimáticos, por lo tanto, las propuestas voltamperométricas desarrolladas en la presente investigación son alternativas novedosa, rápida y selectiva en la cuantificación no enzimática de glucosa y ácido úrico.

Tabla 4.1 Resumen de resultados de las metodologías desarrolladas

Analito	Sensor	Medio pH	Técnica	Muestra	LOD μM	Rango lineal μM	Niveles fisiológicos
Glucosa	Fe ₂ O ₃ - NPs/CPE	NaOH 12.8	DPV	Orina humana	0.044	0.15-1 1-100 30-700	2780 - 5550
Glucosa	MOF MIL- 100 Mn/CPE	0.1 M ABS 5.5	DPV	Orina humana	0.048	0.05 – 5	2780 – 5550
Ácido úrico	Bi ₂ O ₃ - NPs/CPE	0.1 M ABS 5.5	DPV	Orina humana	3.1	5 – 250; 250 – 1000	1400 – 4400
Ácido úrico	Bi ₂ O ₃ - NPs/CPE	0.1 M ABS 5.5	RNA-DPV	Orina humana	---	---	---

Perspectivas

A partir de los resultados presentados en esta tesis doctoral, las perspectivas de trabajos futuros se orientan en los siguientes puntos:

- En una primera instancia sería interesante aplicar los sensores no enzimáticos en muestras sanguíneas humanas para complementar la evaluación de la funcionalidad de las metodologías desarrolladas en el presente trabajo.
- Para el sensor $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-NPs/CPE}$ existe la posibilidad de combinar sus propiedades con otros materiales (polímeros conductores, nanopartículas metálicas o nanotubos de carbono) que permita disminuir el pH del medio de trabajo o el potencial anódico de trabajo.
- También sería interesante evaluar la funcionalidad de los sensores MOF MIL-100 Mn/CPE y $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{-NPs/CPE}$ en soluciones electrolíticas con pH neutro considerando una posible aplicación comercial de los sensores no enzimáticos.
- Además, podría plantearse la evaluación de las propiedades electrocatalíticas de los materiales modificantes ($\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-NPs/CPE}$, MOF MIL-100 Mn/CPE y $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{-NPs/CPE}$) en electrodos serigrafiados para desarrollar sensores electroquímicos portátiles destinados a la cuantificación de los niveles de glicemia y uricemia.
- En el caso de la RNA-DPV se podría emplear muestras sanguíneas para evaluar la capacidad de respuesta de la red neuronal artificial y ampliar los resultados obtenidos en esta presente investigación.

Referencias bibliográficas

1. Cano Perez, J. L., Gutiérrez-Gutiérrez, J., Perezcampos Mayoral, C., Pérez-Campos, E. L., Pina Canseco, M. D. S., Tepech Carrillo, L., & Rojas Laguna, R. (2021). Fiber optic sensors: a review for glucose measurement. *Biosensors*, *11*(3), 61. doi: 10.3390/bios11030061
2. Tian, K., Prestgard, M., & Tiwari, A. (2014). A review of recent advances in nonenzymatic glucose sensors. *Materials Science and Engineering: C*, *41*, 100-118. doi.org/10.1016/j.msec.2014.04.013
3. Ahmed, J., Rashed, M. A., Faisal, M., Harraz, F. A., Jalalah, M., & Alsareii, S. A. (2021). Novel SWCNTs-mesoporous silicon nanocomposite as efficient non-enzymatic glucose biosensor. *Applied Surface Science*, *552*, 149477. doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.149477
4. Safiri, S., Kolahi, A. A., Cross, M., Carson-Chahhoud, K., Hoy, D., Almasi-Hashiani, A., Sepidarkish, M., Ashrafi-Asgarabad, A., Moradi-Lakeh, M., Mansournia, & Smith, E. (2020). Prevalence, Incidence, and Years Lived With Disability Due to Gout and Its Attributable Risk Factors for 195 Countries and Territories 1990-2017: A Systematic Analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)*, *72*(11), 1916–1927. doi.org/10.1002/art.41404
5. Villegas, R., Xiang, Y. B., Elasy, T., Xu, W. H., Cai, H., Cai, Q., ... & Shu, X. O. (2012). Purine-rich foods, protein intake, and the prevalence of hyperuricemia: the Shanghai Men's Health Study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, *22*(5), 409-416. doi.org/10.1016/j.numecd.2010.07.012
6. Galant, A. L., Kaufman, R. C., & Wilson, J. D. (2015). Glucose: Detection and analysis. *Food chemistry*, *188*, 149–160. doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.071
7. Murugan, P., Annamalai, J., Atchudan, R., Govindasamy, M., Nallaswamy, D., Ganapathy, D., Reshetilov, A., & Sundramoorthy, A. K. (2022). Electrochemical Sensing of Glucose Using Glucose Oxidase/PEDOT:4-Sulfocalix [4]arene/MXene Composite Modified Electrode. *Micromachines*, *13*(2), 304. doi.org/10.3390/mi13020304

8. Heikenfeld, J. (2016). Non-invasive analyte access and sensing through eccrine sweat: challenges and outlook circa 2016. *Electroanalysis*, 28(6), 1242-1249. doi.org/10.1002/elan.201600018
9. Hiyoshi, T., Fujiwara, M., & Yao, Z. (2017). Postprandial hyperglycemia and postprandial hypertriglyceridemia in type 2 diabetes. *Journal of biomedical research*, 33(1), 1–16. Advance online publication. doi.org/10.7555/JBR.31.20160164
10. Corrie, S. R., Coffey, J. W., Islam, J., Markey, K. A., & Kendall, M. A. F. (2015). Blood, sweat, and tears: developing clinically relevant protein biosensors for integrated body fluid analysis. *Analyst*, 140(13), 4350-4364. DOI: doi.org/10.1039/C5AN00464K
11. Baliga, S., Muglikar, S., & Kale, R. (2013). Salivary pH: A diagnostic biomarker. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 17(4), 461. doi: 10.4103/0972-124X.118317
12. Gupta, V., & Kaur, A. (2020). Salivary glucose levels in diabetes mellitus patients: A case-control study. *Journal of oral and maxillofacial pathology*, 24(1), 187. doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_15_20
13. Heikenfeld, J. (2016). Non-invasive analyte access and sensing through eccrine sweat: challenges and outlook circa 2016. *Electroanalysis*, 28(6), 1242-1249. doi.org/10.1002/elan.201600018
14. Zafar, H., Channa, A., Jeoti, V., & Stojanović, G. M. (2022). Comprehensive Review on Wearable Sweat-Glucose Sensors for Continuous Glucose Monitoring. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 22(2), 638. doi.org/10.3390/s22020638
15. Makaram, P., Owens, D., & Aceros, J. (2014). Trends in nanomaterial-based non-invasive diabetes sensing technologies. *Diagnostics*, 4(2), 27-46. doi: 10.3390/diagnostics4020027
16. Jing, Y., Chang, S. J., Chen, C. J., & Liu, J. T. (2022). Glucose Monitoring Sensors: History, Principle, and Challenges. *Journal of The Electrochemical Society*. 169,5. doi.org/10.1149/1945-7111/ac6980
17. Wykoff, C. C., Khurana, R. N., Nguyen, Q. D., Kelly, S. P., Lum, F., Hall, R., Abbass, I. M., Abolian, A. M., Stoilov, I., To, T. M., & Garmo, V. (2021). Risk of Blindness

- Among Patients With Diabetes and Newly Diagnosed Diabetic Retinopathy. *Diabetes care*, 44(3), 748–756. doi.org/10.2337/dc20-0413
18. Rathnayake, A., Saboo, A., Malabu, U. H., & Falhammar, H. (2020). Lower extremity amputations and long-term outcomes in diabetic foot ulcers: A systematic review. *World journal of diabetes*, 11(9), 391–399. doi.org/10.4239/wjd.v11.i9.391
 19. Kaneko, M., Fujihara, K., Harada, M. Y., Osawa, T., Yamamoto, M., Kitazawa, M., & Sone, H. (2021). Rates and risk factors for amputation in people with diabetes in Japan: a historical cohort study using a nationwide claims database. *Journal of Foot and Ankle Research*, 14, 1-7. doi: 10.1186/s13047-021-00474-8
 20. Ang G. Y. (2020). Age of onset of diabetes and all-cause mortality. *World journal of diabetes*, 11(4), 95–99. doi.org/10.4239/wjd.v11.i4.95
 21. Asami, H., & Saigusa, H. (2014). Multiple hydrogen-bonding interactions of uric acid/9-methyluric acid with melamine identified by infrared spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(18), 4851-4857. Doi. 10.1021/jp502635w
 22. Soltani, Z., Rasheed, K., Kapusta, D. R., & Reisin, E. (2013). Potential role of uric acid in metabolic syndrome, hypertension, kidney injury, and cardiovascular diseases: is it time for reappraisal?. *Current hypertension reports*, 15, 175-181. doi. 10.1007/s11906-013-0344-5
 23. Latosińska, J. N., Latosińska, M., Seliger, J., Žagar, V., & Kazimierczuk, Z. (2014). An Insight into Prototropism and Supramolecular Motifs in Solid-State Structures of Allopurinol, Hypoxanthine, Xanthine, and Uric Acid. A ¹H–¹⁴N NQDR Spectroscopy, Hybrid DFT/QTAIM, and Hirshfeld Surface-Based Study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(37), 10837-10853. doi: 10.1021/jp504871y
 24. Jin, M., Yang, F., Yang, I., Yin, Y., Luo, J. J., Wang, H., & Yang, X. F. (2012). Uric acid, hyperuricemia and vascular diseases. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 17, 656. doi: 10.2741/3950
 25. Yang, Y., Zhou, W., Wang, Y., & Zhou, R. (2019). Gender-specific association between uric acid level and chronic kidney disease in the elderly health checkup population in China. *Renal Failure*, 41(1), 197-203. doi: 10.1080/0886022X.2019.1591994

26. León-Carmona, J. R., & Galano, A. (2011). Uric and 1-methyluric acids: metabolic wastes or antiradical protectors?. *The Journal of Physical Chemistry B*, *115*(51), 15430-15438. doi: 10.1021/jp209776x
27. Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E., & Hochstein, P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *78*(11), 6858-6862. doi: 10.1073/pnas.78.11.6858
28. Perez-Ruiz, Fernando & Dalbeth, Nicola & Bardin, Thomas. (2014). A Review of Uric Acid, Crystal Deposition Disease, and Gout. *Advances in Therapy*. 32. doi: 10.1007/s12325-014-0175-z.
29. de Oliveira, E. P., & Burini, R. C. (2012). High plasma uric acid concentration: causes and consequences. *Diabetology & metabolic syndrome*, *4*(1), 1-7. doi: 10.1186/1758-5996-4-12
30. Lee, S. M., Lee, A. L., Winters, T. J., Tam, E., Jaleel, M., Stenvinkel, P., & Johnson, R. J. (2009). Low serum uric acid level is a risk factor for death in incident hemodialysis patients. *American Journal of nephrology*, *29*(2), 79–85. doi.org/10.1159/000151292
31. Feng, S., Jiang, L., Shi, Y., Shen, H., Shi, X., Jin, D., Zeng, Y., & Wang, Z. (2013). Uric acid levels and all-cause mortality in peritoneal dialysis patients. *Kidney & blood pressure research*, *37*(2-3), 181–189. doi.org/10.1159/000350143
32. Dao Bui Quy, Q., Pham Ngoc Huy, T., Nguyen Minh, T., Nguyen Duc, L., Nguyen Minh, T., Nguyen Trung, K., Tran Viet, T., Do, Q., & Le Viet, T. (2021). High Serum Uric Acid and High-Sensitivity C Reactive Protein Concentrations Predict Three-Year Cardiovascular Mortality in Patients Treated With Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis. *Cureus*, *13*(9), e17900. doi.org/10.7759/cureus.17900
33. Siu, Y. P., Leung, K. T., Tong, M. K. H., & Kwan, T. H. (2006). Use of allopurinol in slowing the progression of renal disease through its ability to lower serum uric acid level. *American Journal of Kidney Diseases*, *47*(1), 51-59. doi: 10.1053/j.ajkd.2005.10.006
34. Edwards N. L. (2009). The role of hyperuricemia in vascular disorders. *Current opinion in rheumatology*, *21*(2), 132–137. doi.org/10.1097/BOR.0b013e3283257b96

35. Billiet, L., Doaty, S., Katz, J. D., & Velasquez, M. T. (2014). Review of hyperuricemia as new marker for metabolic syndrome. *ISRN rheumatology*, 2014, 852954. doi.org/10.1155/2014/852954
36. Nowak, P. M., Wietecha-Posłuszny, R., & Pawliszyn, J. (2021). White Analytical Chemistry: An approach to reconcile the principles of Green Analytical Chemistry and functionality. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 138, 116223. doi.org/10.1016/j.trac.2021.116223
37. Gardner, I. A., Johnson, W. O., & Norris, M. (2009). Modeling bivariate longitudinal diagnostic outcome data in the absence of a gold standard. *Statistics and its Interface*, 2(2), 171-185. doi.10.4310/SII.2009.v2.n2.a7
38. Luo, W., Zhu, C., Su, S., Li, D., He, Y., Huang, Q., & Fan, C. (2010). Self-catalyzed, self-limiting growth of glucose oxidase-mimicking gold nanoparticles. *Acs Nano*, 4(12), 7451-7458. doi.org/10.1021/nn102592h
39. Peng, Z., Xie, X., Tan, Q., Kang, H., Cui, J., Zhang, X., & Feng, G. (2022). Blood glucose sensors and recent advances: A review. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 15(02), 2230003. doi.org/10.1142/S1793545822300038
40. Janssen, K., & Delanghe, J. (2010). Importance of the pre-analytical phase in blood glucose analysis. *Acta Clinica Belgica*, 65(5), 311-318. DOI: 10.1179/acb.2010.068
41. Dubowski, K. M. (2008). An o-toluidine method for body-fluid glucose determination. *Clinical chemistry*, 54(11), 1919-1920. doi.org/10.1093/clinchem/8.3.215
42. Dai, H., Li, Y., Zhang, Q., Fu, Y., & Li, Y. (2018). A colorimetric biosensor based on enzyme-catalysis-induced production of inorganic nanoparticles for sensitive detection of glucose in white grape wine. *RSC advances*, 8(59), 33960-33967. doi.org/10.1039/C8RA06347H
43. Bisulca, C., Odegaard, N., & Zimmt, W. (2016). Testing for Gums, Starches, and Mucilages in Artifacts with O-toluidine. *Journal of the American Institute for Conservation*, 55(4), 217-227. doi.org/10.1080/01971360.2016.1239492
44. Skeggs T. (2000). Persistent and prayer: from the artificial kidney to the autoanalyzer. *Clinical Chemistry*. 46 (1), 1425-1436. doi.org/10.1093/clinchem/46.9.1425

45. Xiao, J., Liu, Y., Su, L., Zhao, D., Zhao, L., & Zhang, X. (2019). Microfluidic Chip-Based Wearable Colorimetric Sensor for Simple and Facile Detection of Sweat Glucose. *Analytical chemistry*, *91*(23), 14803–14807. doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03110
46. Shi, H., Cao, Y., Zeng, Y., Zhou, Y., Wen, W., Zhang, C., Zhao, Y., & Chen, Z. (2022). Wearable tesla valve-based sweat collection device for sweat colorimetric analysis. *Talanta*, *240*, 123208. doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123208
47. Vaquer, A., , Barón, E., & de la Rica, R., (2021). Detection of low glucose levels in sweat with colorimetric wearable biosensors. *The Analyst*, *146*(10), 3273–3279. doi.org/10.1039/d1an00283j
48. Gonzalez, N. M., Fitch, A., & Al-Bazi, J. (2020). Development of a RP-HPLC method for determination of glucose in *Shewanella oneidensis* cultures utilizing 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatization. *PLoS one*, *15*(3), e0229990. doi.org/10.1371/journal.pone.0229990
49. Georgelis, N., Fencil, K., & Richael, C. M. (2018). Validation of a rapid and sensitive HPLC/MS method for measuring sucrose, fructose and glucose in plant tissues. *Food chemistry*, *262*, 191–198. doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.051
50. Yeganeh-Zare, S., Farhadi, K., & Amiri, S. (2022). Rapid detection of apple juice concentrate adulteration with date concentrate, fructose and glucose syrup using HPLC-RID incorporated with chemometric tools. *Food chemistry*, *370*, 131015. doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131015
51. Chen, L., Hwang, E., & Zhang, J. (2018). Fluorescent Nanobiosensors for Sensing Glucose. *Sensors (Basel, Switzerland)*, *18*(5), 1440. doi.org/10.3390/s18051440
52. Hong, G. L., Deng, H. H., Zhao, H. L., Zou, Z. Y., Huang, K. Y., Peng, H. P., Liu, Y. H., & Chen, W. (2020). Gold nanoclusters/graphene quantum dots complex-based dual-emitting ratiometric fluorescence probe for the determination of glucose. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, *189*, 113480. doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113480
53. Wu, Y., Gao, Y., & Du, J. (2019). Bifunctional gold nanoclusters enable ratiometric fluorescence nanosensing of hydrogen peroxide and glucose. *Talanta*, *197*, 599–604. doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.087

54. Bernardo-Bermejo, S., Sánchez-López, E., Castro-Puyana, M., Benito-Martínez, S., Lucio-Cazaña, F. J., & Marina, M. L. (2020). A Non-Targeted Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry Strategy to Study Metabolic Differences in an In vitro Model of High-Glucose Induced Changes in Human Proximal Tubular HK-2 Cells. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *25*(3), 512. doi.org/10.3390/molecules25030512
55. Zhang, H., Li, J., Zhao, S., Ding, X., & Wang, Z. (2015). *Se pu = Chinese journal of chromatography*, *33*(8), 816–821. doi.org/10.3724/sp.j.1123.2015.03042
56. Shabbir, S.A., Shamaila, S., Sharif, R., Zafar, N., Latif, H., & Ashiq, M.G. (2020). Electrophoretic Deposition of Uniform Carbon Nanotubes for Nickel Nanocomposites Based Nonenzymatic Glucose Sensor. *Sensor Letters*, *18*, 427-435. doi.org/10.1166/sl.2020.4237
57. Gao, Y., Huang, Y., Chen, J., Liu, Y., Xu, Y., & Ning, X. (2021). A Novel Luminescent "Nanochip" as a Tandem Catalytic System for Chemiluminescent Detection of Sweat Glucose. *Analytical chemistry*, *93*(30), 10593–10600. doi.org/10.1021/acs.analchem.1c01798
58. Calabria, D., Zangheri, M., Trozzi, I., Lazzarini, E., Pace, A., Mirasoli, M., & Guardigli, M. (2021). Smartphone-Based Chemiluminescent Origami μ PAD for the Rapid Assessment of Glucose Blood Levels. *Biosensors*, *11*(10), 381. doi.org/10.3390/bios11100381
59. Haddad Irani-Nezhad, M., Hassanzadeh, J., Khataee, A., & Orooji, Y. (2019). A Chemiluminescent Method for the Detection of H₂O₂ and Glucose Based on Intrinsic Peroxidase-Like Activity of WS₂ Quantum Dots. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*(4), 689. doi.10.3390/molecules24040689
60. Ortiz-Aguayo, D., Bonet-San-Emeterio, M., & Del Valle, M. (2019). Simultaneous Voltammetric Determination of Acetaminophen, Ascorbic Acid and Uric Acid by Use of Integrated Array of Screen-Printed Electrodes and Chemometric Tools. *Sensors (Basel, Switzerland)*, *19*(15), 3286. doi.org/10.3390/s19153286
61. Haghparas, Z.; Kordrostami, Z.; Sorouri, M.; Rajabzadeh, M.; Khalifeh, R. Highly sensitive non-enzymatic electrochemical glucose sensor based on dumbbell-shaped

- double-shelled hollow nanoporous CuO/ZnO microstructures. *Scientific Reports* **2021**, *11*(1), 1-12. doi.org/10.1038/s41598-020-79460-2
62. Gabison L., Chiadmi M., Colloc'h N., Castro B., El Hajji M., Prangé T. (2006). Recapture of [S]-allantoin, the product of the two-step degradation of uric acid, by urate oxidase. *FEBS Lett.* *580*(1), 2087–2091. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.03.007
63. Zhao, Y., Yang, X., Lu, W., Liao, H., & Liao, F. (2009). Uricase based methods for determination of uric acid in serum. *Microchimica Acta*, *164*, 1-6. doi.org/10.1007/s00604-008-0044-z
64. Kopčič, M., & Kand'ár, R. (2023). Screening method for the simultaneous determination of allantoin and uric acid from dried blood spots. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *225*, 115222. doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115222
65. Wang, X., Lu, J., Tang, X., & Qiu, P. (2020). Colorimetric detection of uric acid with high sensitivity using Cu₂O@ Ag nanocomposites. *Chemistry Africa*, *3*, 749-758. doi.org/10.1007/s42250-020-00122-x
66. Gabriel, E. F., Garcia, P. T., Cardoso, T. M., Lopes, F. M., Martins, F. T., & Coltro, W. K. (2016). Highly sensitive colorimetric detection of glucose and uric acid in biological fluids using chitosan-modified paper microfluidic devices. *Analyst*, *141*(15), 4749-4756. doi.org/10.1039/C6AN00430J
67. Wang, X., Ma, Y., Zhao, M., Zhou, M., Xiao, Y., Sun, Z., & Tong, L. (2016). Determination of glucose in human stomach cancer cell extracts and single cells by capillary electrophoresis with a micro-biosensor. *Journal of Chromatography A*, *1469*, 128-134. doi.org/10.1016/j.chroma.2016.09.054
68. Wijemanne, N., Soysa, P., Wijesundara, S., & Perera, H. (2018). Development and validation of a simple high performance liquid chromatography/UV method for simultaneous determination of urinary uric acid, hypoxanthine, and creatinine in human urine. *International journal of analytical chemistry*, *2018*. doi.org/10.1155/2018/1647923
69. Kand'ár, R., Drábková, P., & Hampl, R. (2011). The determination of ascorbic acid and uric acid in human seminal plasma using an HPLC with UV detection. *Journal of Chromatography B*, *879*(26), 2834-2839. doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.08.007

70. Pleskacova, A., Brejcha, S., Pacal, L., Kankova, K., & Tomandl, J. (2017). Simultaneous determination of uric acid, xanthine and hypoxanthine in human plasma and serum by hplc–uv: Uric acid metabolism tracking. *Chromatographia*, *80*, 529-536. doi.org/10.1007/s10337-016-3208-8
71. Wu, M., Zhang, W., Shen, X., & Wang, W. (2021). Simultaneous determination of purines and uric acid in Chinese chicken broth using TFA/FA hydrolysis coupled with HPLC-VWD. *Foods*, *10*(11), 2814. doi.org/10.3390/foods10112814
72. Guan, Y., Chu, Q., & Ye, J. (2004). Determination of uric acid in human saliva by capillary electrophoresis with electrochemical detection: potential application in fast diagnosis of gout. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *380*, 913-917. doi.org/10.1007/s00216-004-2848-y
73. Zhao, M., Zhou, M. F., Feng, H., Cong, X. X., & Wang, X. L. (2016). Determination of tryptophan, glutathione, and uric acid in human whole blood extract by capillary electrophoresis with a one-step electrochemically reduced graphene oxide modified microelectrode. *Chromatographia*, *79*(13-14), 911-918. doi.org/10.1007/s10337-016-3115-z
74. Muñoz, J. A., López-Mesas, M., & Valiente, M. (2010). Development and validation of a simple determination of urine metabolites (oxalate, citrate, uric acid and creatinine) by capillary zone electrophoresis. *Talanta*, *81*(1-2), 392-397. doi.org/10.1016/j.talanta.2009.12.014
75. Chaudhari, R. D., Joshi, A. B., & Srivastava, R. (2012). Uric acid biosensor based on chemiluminescence detection using a nano-micro hybrid matrix. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *173*, 882-889. doi.org/10.1016/j.snb.2012.08.001
76. Wang, J., Tan, X., & Song, Z. (2013). Comparison of uric acid quantity with different food in human urine by flow injection chemiluminescence analysis. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, *2013*. doi.org/10.1155/2013/854041
77. Amjadi, M., Manzoori, J. L., & Hallaj, T. (2014). Chemiluminescence of graphene quantum dots and its application to the determination of uric acid. *Journal of luminescence*, *153*, 73-78. doi.org/10.1016/j.jlumin.2014.03.020
78. Wang, C. Y., Huang, C. W., Wei, T. T., Wu, M. Y., & Lin, Y. W. (2017). Fluorescent detection of uric acid in biological samples through the inhibition of cobalt (II)

- catalyzed Amplex UltraRed. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 244, 357-364. doi.org/10.1016/j.snb.2017.01.007
79. Sahoo, P., Das, S., Sarkar, H. S., Maiti, K., Uddin, M. R., & Mandal, S. (2017). Selective fluorescence sensing and quantification of uric acid by naphthyridine-based receptor in biological sample. *Bioorganic chemistry*, 71, 315-324. doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.03.002
80. Qi, W., Zhao, M., Fu, Y., He, H., Tian, X., Wu, D., & Hu, P. P. (2020). Fluorescent detection of uric acid through photoinduced electron transfer using luminol-terbium (III) nanoparticles synthesized via aggregation-induced fluorescence strategy. *Dyes and Pigments*, 172, 107797. doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107797
81. I Apetrei, I. M., & Apetrei, C. (2019). Development of a novel biosensor based on tyrosinase/platinum nanoparticles/chitosan/graphene nanostructured layer with applicability in bioanalysis. *Materials*, 12(7), 1009. doi.org/10.3390/ma12071009
82. Mahmudiono, T., Bokov, D. O., Jasim, S. A., Abdelbasset, W. K., & Khashirbaeva, D. M. (2022). State-of-the-art of convenient and low-cost electrochemical sensor for food contamination detection: Technical and analytical overview. *Microchemical Journal*, 107460. doi.org/10.1016/j.microc.2022.107460
83. Vilas-Boas, Â., Valderrama, P., Fontes, N., Geraldo, D., & Bento, F. (2019). Evaluation of total polyphenol content of wines by means of voltammetric techniques: Cyclic voltammetry vs differential pulse voltammetry. *Food chemistry*, 276, 719-725. doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.078
84. Tajik, S., Beitollahi, H., Nejad, F. G., Safaei, M., Zhang, K., Van Le, Q., ... & Shokouhimehr, M. (2020). Developments and applications of nanomaterial-based carbon paste electrodes. *RSC advances*, 10(36), 21561-21581. DOI: 10.1039/D0RA03672B
85. Gavaghan, D. J., & Bond, A. M. (2000). A complete numerical simulation of the techniques of alternating current linear sweep and cyclic voltammetry: analysis of a reversible process by conventional and fast Fourier transform methods. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 480(1-2), 133-149. doi.org/10.1016/S0022-0728(99)00476-3

86. Davies, T. J., & Compton, R. G. (2005). The cyclic and linear sweep voltammetry of regular and random arrays of microdisc electrodes: Theory. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 585(1), 63-82. doi.org/10.1016/j.jelechem.2005.07.022
87. Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., & Dempsey, J. L. (2018). A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. *Journal of chemical education*, 95(2), 197-206. doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361
88. Pournaghi-Azar, M. H., & Saadatirad, A. (2010). Simultaneous determination of paracetamol, ascorbic acid and codeine by differential pulse voltammetry on the aluminum electrode modified by thin layer of palladium. *Electroanalysis*, 22(14), 1592-1598. doi.org/10.1002/elan.200900542
89. Pournaghi-Azar, M. H., & Saadatirad, A. (2010). Simultaneous determination of paracetamol, ascorbic acid and codeine by differential pulse voltammetry on the aluminum electrode modified by thin layer of palladium. *Electroanalysis*, 22(14), 1592-1598. doi.org/10.1002/elan.200900542
90. Nagal, V., Masrat, S., Khan, M., Alam, S., Ahmad, A., Alshammari, M. B., & Ahmad, R. (2023). Highly Sensitive Electrochemical Non-Enzymatic Uric Acid Sensor Based on Cobalt Oxide Puffy Balls-like Nanostructure. *Biosensors*, 13(3), 375. doi.org/10.3390/bios13030375
91. Wang, F., Shi, F., Chen, C., Huang, K., Chen, N., & Xu, Z. (2022). Electrochemical fabrication of Co(OH)₂ nanoparticles decorated carbon cloth for non-enzymatic glucose and uric acid detection. *Microchimica Acta*, 189(10), 385. doi.org/10.1007/s00604-022-05437-9
92. Wang, Y., Xu, H., Zhang, J., & Li, G. (2008). Electrochemical sensors for clinic analysis. *Sensors*, 8(4), 2043-2081. doi.org/10.3390/s8042043
93. Mehrvar, M., & Abdi, M. (2004). Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors. *Analytical sciences*, 20(8), 1113-1126. doi.org/10.2116/analsci.20.1113
94. Majeed, S., Naqvi, S. T. R., ul Haq, M. N., & Ashiq, M. N. (2022). Electroanalytical techniques in biosciences: conductometry, coulometry, voltammetry, and electrochemical sensors. In *Analytical Techniques in Biosciences* (pp. 157-178). Academic Press. doi.org/10.1016/B978-0-12-822654-4.00004-X

95. Rodriguez, C., Dietrich, P., Torres-Costa, V., Cebrián, V., Gómez-Abad, C., Díaz, A., & Silván, M. M. (2019). Near ambient pressure X-ray photoelectron spectroscopy monitoring of the surface immobilization cascade on a porous silicon-gold nanoparticle FET biosensor. *Applied Surface Science*, 492, 362-368. doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.06.056
96. Ostojčić, J., Herenda, S., Bešić, Z., Miloš, M., & Galić, B. (2017). Advantages of an electrochemical method compared to the spectrophotometric kinetic study of peroxidase inhibition by boroxine derivative. *Molecules*, 22(7), 1120. doi.org/10.3390/molecules22071120
97. Norouzi, P., Haji-Hashemi, H., Larijani, B., Aghazadeh, M., Pourbasheer, E., & R Ganjali, M. (2017). Application of new advanced electrochemical methods combine with nano-based materials sensor in drugs analysis. *Current Analytical Chemistry*, 13(1), 70-80. doi.10.2174/1573411012666160601150841
98. Davis F, Higson SPJ (2012) Practical applications and protocols for enzyme biosensors. In: Biosensors for Medical Applications. Elsevier Masson SAS., Granfield, pp 135–160. doi.org/10.1533/9780857097187.1.135
99. Vaddiraju, S., Tomazos, I., Burgess, D. J., Jain, F. C., & Papadimitrakopoulos, F. (2010). Emerging synergy between nanotechnology and implantable biosensors: a review. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(7), 1553-1565. doi.org/10.1016/j.bios.2009.12.001
100. Nanjo, M., & Guilbault, G. G. (1974). Enzyme electrode sensing oxygen for uric acid in serum and urine. *Analytical Chemistry*, 46(12), 1769-1772. doi.org/10.1021/ac60348a058
101. Crosnier de Lassichere, C., Latapie, L., Evrard, D., & Gros, P. (2018). New Insight into the EC Mechanism of Uric Acid Regeneration in the Presence of Ascorbic Acid on a Poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) Modified Gold Electrode. *Electroanalysis*, 30(8), 1653-1658. doi.org/10.1002/elan.201800024
102. Tonyushkina, K., & Nichols, J. H. (2009). Glucose meters: a review of technical challenges to obtaining accurate results. *Journal of diabetes science and technology*, 3(4), 971-980. doi: 10.1177/193229680900300446

103. Khadilkar, K. S., Bandgar, T., Shivane, V., Lila, A., & Shah, N. (2013). Current concepts in blood glucose monitoring. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 17(Suppl 3). doi: 10.4103/2230-8210.123556
104. Gao D., Qu Y., Li T., Shrestha K. & Song Y. (2014). Development of Amperometric Glucose Biosensor Based on Prussian Blue Functionalized TiO₂ Nanotube Arrays. *Scientific reports*. **4(1)**, 689. doi.org/10.1038/srep06891
105. Ngo, H. T., Hoa, L. T., Khanh, N. T., Hoa, T. T. B., Toan, T. T. T., Mau, T. X., & Khieu, D. Q. (2020). ZIF-67/g-C₃N₄-modified electrode for simultaneous voltammetric determination of uric acid and acetaminophen with cetyltrimethylammonium bromide as discriminating agent. *Journal of Nanomaterials*, 2020, 1-13. doi.org/10.1155/2020/7915878
106. Wei, M., Qiao, Y., Zhao, H., Liang, J., Li, T., Luo, Y., & Sun, X. (2020). Electrochemical non-enzymatic glucose sensors: Recent progress and perspectives. *Chemical Communications*, 56(93), 14553-14569. doi.org/10.1039/D0CC05650B
107. Dey, B., Ahmad, M. W., Sarkhel, G., Yang, D. J., & Choudhury, A. (2022). Fabrication of porous nickel (II)-based MOF@ carbon nanofiber hybrid mat for high-performance non-enzymatic glucose sensing. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 142, 106500. doi.org/10.1016/j.mssp.2022.106500
108. Tee, S. Y., Teng, C. P., & Ye, E. (2017). Metal nanostructures for non-enzymatic glucose sensing. *Materials Science and Engineering: C*, 70, 1018-1030. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.04.009>
109. Eryiğit, M., Urhan, B. K., Doğan, H. Ö., Özer, T. Ö., & Demir, Ü. (2022). ZnO nanosheets-decorated ERGO layers: An efficient electrochemical sensor for non-enzymatic uric acid detection. *IEEE Sensors Journal*, 22(6), 5555-5561. doi. 10.1109/JSEN.2022.3150088
110. Kanchana, P., Navaneethan, M., & Sekar, C. (2017). Fabrication of Ce doped hydroxyapatite nanoparticles based non-enzymatic electrochemical sensor for the simultaneous determination of norepinephrine, uric acid and tyrosine. *Materials Science and Engineering: B*, 226, 132-140. doi.org/10.1016/j.mseb.2017.09.015

111. Modena, M. M., Rühle, B., Burg, T. P., & Wuttke, S. (2019). Nanoparticle characterization: what to measure?. *Advanced Materials*, 31(32), 1901556. <https://doi.org/10.1002/adma.201901556>
112. Malathi, S., Pakrudheen, I., Kalkura, S. N., Webster, T. J., & Balasubramanian, S. (2022). Disposable biosensors based on metal nanoparticles. *Sensors International*, 100169. doi.org/10.1016/j.sintl.2022.100169
113. Balkourani, G., Damartzis, T., Brouzgou, A., & Tsiakaras, P. (2022). Cost effective synthesis of graphene nanomaterials for non-enzymatic electrochemical sensors for glucose: a comprehensive review. *Sensors*, 22(1), 355. doi.org/10.3390/s22010355
114. Jamkhande, P. G., Ghule, N. W., Bamer, A. H., & Kalaskar, M. G. (2019). Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. *Journal of drug delivery science and technology*, 53, 101174. doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101174
115. Shamsabadi, A. S., Tavanai, H., Ranjbar, M., Farnood, A., & Bazarganipour, M. (2020). Electrochemical non-enzymatic sensing of glucose by gold nanoparticles incorporated graphene nanofibers. *Materials Today Communications*, 24, 100963. doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.100963
116. Deshmukh, M. A., Kang, B. C., & Ha, T. J. (2020). Non-enzymatic electrochemical glucose sensors based on polyaniline/reduced-graphene-oxide nanocomposites functionalized with silver nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry C*, 8(15), 5112-5123. doi.org/10.1039/C9TC06836H
117. Rathod, D., Dickinson, C., Egan, D., & Dempsey, E. (2010). Platinum nanoparticle decoration of carbon materials with applications in non-enzymatic glucose sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 143(2), 547-554. doi.org/10.1016/j.snb.2009.09.064
118. Karimi-Maleh, H., Cellat, K., Arıkan, K., Savk, A., Karimi, F., & Şen, F. (2020). Palladium–Nickel nanoparticles decorated on Functionalized-MWCNT for high precision non-enzymatic glucose sensing. *Materials Chemistry and Physics*, 250, 123042. doi.org/10.1016/j.matchemphys.2020.123042

119. Naikoo, G. A., Salim, H., Hassan, I. U., Awan, T., Arshad, F., Pedram, M. Z., & Qurashi, A. (2021). Recent advances in non-enzymatic glucose sensors based on metal and metal oxide nanostructures for diabetes management-a review. *Frontiers in Chemistry*, 9, 748957. doi.org/10.3389/fchem.2021.748957
120. Liu, S., Zeng, W., Guo, Q., & Li, Y. (2020). Metal oxide-based composite for non-enzymatic glucose sensors. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 31, 16111-16136. doi.org/10.1007/s10854-020-04239-0
121. Agnihotri, A. S., Varghese, A., & Nidhin, M. (2021). Transition metal oxides in electrochemical and bio sensing: A state-of-art review. *Applied Surface Science Advances*, 4, 100072. https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2021.100072
122. Hassan, I. U., Salim, H., Naikoo, G. A., Awan, T., Dar, R. A., Arshad, F., & Qurashi, A. (2021). A review on recent advances in hierarchically porous metal and metal oxide nanostructures as electrode materials for supercapacitors and non-enzymatic glucose sensors. *Journal of Saudi Chemical Society*, 25(5), 101228. https://doi.org/10.1016/j.jscs.2021.101228
123. Zhu, H., Li, L., Zhou, W., Shao, Z., & Chen, X. (2016). Advances in non-enzymatic glucose sensors based on metal oxides. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(46), 7333-7349. doi.org/10.1039/C6TB02037B
124. Park, S., Boo, H., & Chung, T. D. (2006). Electrochemical non-enzymatic glucose sensors. *Analytica chimica acta*, 556(1), 46-57. doi.org/10.1016/j.aca.2005.05.080
125. Kang, L., He, D., Bie, L., & Jiang, P. (2015). Nanoporous cobalt oxide nanowires for non-enzymatic electrochemical glucose detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 220, 888-894. doi.org/10.1016/j.snb.2015.06.015
126. Dhara, K., & Mahapatra, D. R. (2018). Electrochemical nonenzymatic sensing of glucose using advanced nanomaterials. *Microchimica Acta*, 185, 1-32. doi.org/10.1007/s00604-017-2609-1
127. Somashekharappa, K. K., Halappa, R. B., & Rajendrachari, S. (2023). Green Chemistry Applications in Electrochemical Sensors. In *Recent Developments in Green Electrochemical Sensors: Design, Performance, and Applications* (pp. 23-37). American Chemical Society. DOI: 10.1021/bk-2023-1437.ch002

128. He, J., Li, M., Zhou, S., & Zhou, W. (2023). Recent advances in perovskite oxides for non-enzymatic electrochemical sensors: A review. *Analytica Chimica Acta*, 341007. doi.org/10.1016/j.aca.2023.341007
129. Qu, K., Wang, S., He, W., Yin, H., Wang, L., & Zheng, Y. (2023). Ternary metal oxide nanorods (Ni_{0.5}Cu_{0.5}Co₂O₄) as efficient positive materials for non-enzymatic glucose sensing and fuel cell application. *Solid State Sciences*, 135, 107070. doi.org/10.1016/j.solidstatesciences.2022.107070
130. Juang, F. R., & Tsai, T. L. (2023). Synthesis and characterization of CuO nanostructures on ZnO nanotubes for non-enzymatic detection of glucose. *Materials Chemistry and Physics*, 295, 127207. doi.org/10.1016/j.matchemphys.2022.127207
131. Alizadeh, T., & Zargr, F. (2020). Highly selective and sensitive iodide sensor based on carbon paste electrode modified with nanosized sulfate-doped α -Fe₂O₃. *Materials Chemistry and Physics*, 240, 122118. doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.122118
132. Roberts, A. P., Zhao, X., Heslop, D., Abrajevitch, A., Chen, Y. H., Hu, P., ... & Pillans, B. J. (2020). Hematite (α -Fe₂O₃) quantification in sedimentary magnetism: limitations of existing proxies and ways forward. *Geoscience Letters*, 7(1), 8. doi.org/10.1186/s40562-020-00157-5
133. Kushwaha, C. S., & Shukla, S. K. (2020). Electrochemical sensing of paracetamol using iron oxide encapsulated in chitosan-grafted-polyaniline. *ACS Applied Polymer Materials*, 2(6), 2252-2259. doi.org/10.1021/acsapm.0c00239
134. Suresh, R., Vijayaraj, A., Giribabu, K., Manigandan, R., Prabu, R., Stephen, A., & Narayanan, V. (2013). Fabrication of iron oxide nanoparticles: magnetic and electrochemical sensing property. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 24, 1256-1263. doi.org/10.1007/s10854-012-0916-1
135. Amara, U., Mahmood, K., Awais, M., Khalid, M., Nasir, M., Riaz, S., ... & Nawaz, M. H. (2022). Nickel-doped iron oxide nanoparticle-conjugated porphyrin interface (porphyrin/Fe₂O₃@ Ni) for the non-enzymatic detection of dopamine from lacrimal fluid. *Dalton Transactions*, 51(13), 5098-5107. doi.org/10.1039/D2DT00074A

136. Benny, L., Krishnan, G., Agnihotri, A. S., Akshaya, K. B., Varghese, A., & Nidhin, M. (2021). A sustainable non-enzymatic approach for determination of cholesterol using piper nigrum derived porous carbon/ α -Fe₂O₃ composite electrode. *Journal of The Electrochemical Society*, 168(5), 057501. DOI 10.1149/1945-7111/abf8d3
137. Radhakrishnan, S., Lakshmy, S., Santhosh, S., Kalarikkal, N., Chakraborty, B., & Rout, C. S. (2022). Recent Developments and Future Perspective on Electrochemical Glucose Sensors Based on 2D Materials. *Biosensors*, 12(7), 467. doi.org/10.3390/bios12070467
138. Karthik, V., Selvakumar, P., Kumar, P. S., Satheeskumar, V., Vijaysunder, M. G., Hariharan, S., & Antony, K. (2022). Recent advances in electrochemical sensor developments for detecting emerging pollutant in water environment. *Chemosphere*, 135331. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135331
139. Jagdale, P., Serino, G., Oza, G., Audenino, A. L., Bignardi, C., Tagliaferro, A., & Alvarez-Gayosso, C. (2021). Physical characterization of bismuth oxide nanoparticle based ceramic composite for future biomedical application. *Materials*, 14(7), 1626. doi.org/10.3390/ma14071626
140. Sayyed, M. I., Alrashedi, M. F., Almuqrin, A. H., & Elsafi, M. (2022). Recycling and optimizing waste lab glass with Bi₂O₃ nanoparticles to use as a transparent shield for photons. *Journal of Materials Research and Technology*, 17, 2073-2083. doi.org/10.1016/j.jmrt.2022.01.113
141. Tang, X., Chen, Z., Chen, Y., Jiang, X., Zhu, F., Liu, S., & Wan, K. (2023). Hybrid bismuth oxide-graphene oxide nanomaterials improve the signal-to-noise response of small molecules analyzed by matrix assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Talanta*, 252, 123768. doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123768
142. Mahmoud, B. G., Khairy, M., Rashwan, F. A., & Banks, C. E. (2017). Simultaneous voltammetric determination of acetaminophen and isoniazid (hepatotoxicity-related drugs) utilizing bismuth oxide nanorod modified screen-printed electrochemical sensing platforms. *Analytical chemistry*, 89(3), 2170-2178. doi.org/10.1021/acs.analchem.6b05130

143. Kusuma, K. B., Manju, M., Ravikumar, C. R., Dileepkumar, V. G., Kumar, A. N., Santosh, M. S., ... & Gurushantha, K. (2022). Probe sonicated synthesis of bismuth oxide (Bi_2O_3): photocatalytic application and electrochemical sensing of ascorbic acid and lead. *Journal of Nanomaterials*, 2022. doi.org/10.1155/2022/3256611
144. Sinha, G. N., Subramanyam, P., Sivaramakrishna, V., & Subrahmanyam, C. (2021). Electrodeposited copper bismuth oxide as a low-cost, non-enzymatic electrochemical sensor for sensitive detection of uric acid and hydrogen peroxide. *Inorganic Chemistry Communications*, 129, 108627. doi.org/10.1016/j.inoche.2021.108627
145. Chuang, C. H., & Kung, C. W. (2020). Metal–organic frameworks toward electrochemical sensors: challenges and opportunities. *Electroanalysis*, 32(9), 1885–1895. https://doi.org/10.1002/elan.202060111
146. Zhang, X., Zhang, S., Tang, Y., Huang, X., & Pang, H. (2022). Recent advances and challenges of metal–organic framework/graphene-based composites. *Composites Part B: Engineering*, 230, 109532. doi.org/10.1016/j.compositesb.2021.109532
147. Shi, W., Li, W., Nguyen, W., Chen, W., Wang, J., & Chen, M. (2022). Advances of metal organic frameworks in analytical applications. *Materials Today Advances*, 15, 100273. doi.org/10.1016/j.mtadv.2022.100273
148. Palakollu, V. N., Chen, D., Tang, J. N., Wang, L., & Liu, C. (2022). Recent advancements in metal-organic frameworks composites based electrochemical (bio) sensors. *Microchimica Acta*, 189(4), 161. doi.org/10.1007/s00604-022-05238-0
149. Liu, C., Wang, J., Wan, J., & Yu, C. (2021). MOF-on-MOF hybrids: Synthesis and applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 432, 213743. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213743
150. Shinde, S. K., Kim, D. Y., Kumar, M., Murugadoss, G., Ramesh, S., Tamboli, A. M., & Yadav, H. M. (2022). MOFs-graphene composites synthesis and application for electrochemical supercapacitor: a review. *Polymers*, 14(3), 511. doi.org/10.3390/polym14030511

151. Ding, M., Liu, W., & Gref, R. (2022). Nanoscale MOFs: From synthesis to drug delivery and theranostics applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 114496. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114496>
152. Tajik, S., Beitollahi, H., Nejad, F. G., Sheikhshoae, I., Nugraha, A. S., Jang, H. W., & Shokouhimehr, M. (2021). Performance of metal–organic frameworks in the electrochemical sensing of environmental pollutants. *Journal of Materials Chemistry A*, 9(13), 8195-8220. doi.org/10.1039/D0TA08344E
153. Annamalai, J., Murugan, P., Ganapathy, D., Nallaswamy, D., Atchudan, R., Arya, S., & Sundramoorthy, A. K. (2022). Synthesis of various dimensional metal organic frameworks (MOFs) and their hybrid composites for emerging applications—a review. *Chemosphere*, 134184. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134184
154. Wee, L. H., Meledina, M., Turner, S., Van Tendeloo, G., Zhang, K., Rodriguez-Albelo, L. M., & Martens, J. A. (2017). 1D-2D-3D Transformation Synthesis of Hierarchical Metal–Organic Framework Adsorbent for Multicomponent Alkane Separation. *Journal of the American Chemical Society*, 139(2), 819-828. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b10768>
155. Kajal, N., Singh, V., Gupta, R., & Gautam, S. (2022). Metal organic frameworks for electrochemical sensor applications: A review. *Environmental Research*, 204, 112320. doi.org/10.1016/j.envres.2021.112320
156. Gonçalves, J. M., Martins, P. R., Rocha, D. P., Matias, T. A., Juliao, M. S., Munoz, R. A., & Angnes, L. (2021). Recent trends and perspectives in electrochemical sensors based on MOF-derived materials. *Journal of Materials Chemistry C*, 9(28), 8718-8745. doi.org/10.1039/D1TC02025K
157. Baranwal, J., Barse, B., Gatto, G., Broncova, G., & Kumar, A. (2022). Electrochemical sensors and their applications: a review. *Chemosensors*, 10(9), 363. doi.org/10.3390/chemosensors10090363
158. Wu, T., Prasetya, N., & Li, K. (2020). Recent advances in aluminium-based metal-organic frameworks (MOF) and its membrane applications. *Journal of Membrane Science*, 615, 118493. doi.org/10.1016/j.memsci.2020.118493
159. Zhong, Y., Liu, W., Rao, C., Li, B., Wang, X., Liu, D., ... & Liu, J. (2021). Recent advances in Fe-mof compositions for biomedical applications. *Current*

- Medicinal Chemistry*, 28(30), 6179-6198.
doi.org/10.2174/0929867328666210511014129
160. Chen, D., Zhang, Y., Mao, P., Jiang, X., Li, J., Sun, A., & Shen, J. (2021). Carbon black supported on a Mn-MIL-100 framework as high-efficiency electrocatalysts for nitrophenol reduction. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 903, 115824. doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115824
161. Nandi, S., Sharma, E., Trivedi, V., & Biswas, S. (2018). Metal–organic framework showing selective and sensitive detection of exogenous and endogenous formaldehyde. *Inorganic Chemistry*, 57(24), 15149-15157. doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b02411
162. Sundriyal, S., Shrivastav, V., Sharma, M., Mishra, S., & Deep, A. (2019). Redox additive electrolyte study of Mn–MOF electrode for supercapacitor applications. *Chemistry Select*, 4(9), 2585-2592. doi.org/10.1002/slct.201900305
163. Zhang, X., Li, H., Hou, F., Yang, Y., Dong, H., Liu, N., ... & Cui, L. (2017). Synthesis of highly efficient Mn₂O₃ catalysts for CO oxidation derived from Mn-MIL-100. *Applied Surface Science*, 411, 27-33. doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.03.179
164. Ha, Y., Mu, M., Liu, Q., Ji, N., Song, C., & Ma, D. (2018). Mn-MIL-100 heterogeneous catalyst for the selective oxidative cleavage of alkenes to aldehydes. *Catalysis Communications*, 103, 51-55. doi.org/10.1016/j.catcom.2017.08.017
165. Zhang, X., Lv, X., Bi, F., Lu, G., & Wang, Y. (2020). Highly efficient Mn₂O₃ catalysts derived from Mn-MOFs for toluene oxidation: The influence of MOFs precursors. *Molecular Catalysis*, 482, 110701. doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110701
166. Chen, D., Zhang, Y., Mao, P., Jiang, X., Li, J., Sun, A., & Shen, J. (2021). Carbon black supported on a Mn-MIL-100 framework as high-efficiency electrocatalysts for nitrophenol reduction. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 903, 115824. doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115824
167. Chen, X., He, F., & Liu, S. (2020). CuO/MnO_x composites obtained from Mn-MIL-100 precursors as efficient catalysts for the catalytic combustion of chlorobenzene. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*, 130, 1063-1076. doi.org/10.1007/s11144-020-01816-6

168. Zhang, B., Hao, S., Xiao, D., Wu, J., & Huang, Y. (2016). Templated formation of porous Mn₂O₃ octahedra from Mn-MIL-100 for lithium-ion battery anode materials. *Materials & Design*, *98*, 319-323. doi.org/10.1016/j.matdes.2016.03.041
169. Wang, R., Hu, Y., Pan, Z., & Wang, J. (2020). MOF-derived manganese oxide/carbon nanocomposites with raised capacitance for stable asymmetric supercapacitor. *RSC advances*, *10*(57), 34403-34412. doi:10.1039/D0RA05494A
170. Erden, P. E., & Kılıç, E. (2013). A review of enzymatic uric acid biosensors based on amperometric detection. *Talanta*, *107*, 312-323. doi.org/10.1016/j.talanta.2013.01.043
171. Si, P., Huang, Y., Wang, T., & Ma, J. (2013). Nanomaterials for electrochemical non-enzymatic glucose biosensors. *RSC advances*, *3*(11), 3487-3502. doi.10.1039/C2RA22360K
172. Derina, K., Korotkova, E., & Barek, J. (2020). Non-enzymatic electrochemical approaches to cholesterol determination. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *191*, 113538. doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113538
173. Poletti Papi, M. A., Caetano, F. R., Bergamini, M. F., & Marcolino-Junior, L. H. (2017). Facile synthesis of a silver nanoparticles/polypyrrole nanocomposite for non-enzymatic glucose determination. *Materials Science and Engineering: C*, *75*, 88–94. doi:10.1016/j.msec.2017.02.026
174. Espro, C., Marini, S., Giusi, D., Ampelli, C., & Neri, G. (2020). Non-enzymatic screen printed sensor based on Cu₂O nanocubes for glucose determination in bio-fermentation processes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 114354. doi:10.1016/j.jelechem.2020.11435
175. Zhang, Y., Wang, Y., Jia, J., & Wang, J. (2012). Nonenzymatic glucose sensor based on graphene oxide and electrospun NiO nanofibers. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *171-172*, 580–587. doi:10.1016/j.snb.2012.05.037
176. Zhang, H., & Liu, S. (2017). A combined self-assembly and calcination method for preparation of nanoparticles-assembled cobalt oxide nanosheets using graphene oxide as template and their application for non-enzymatic glucose

- biosensing. *Journal of Colloid and Interface Science*, 485, 159–166. doi:10.1016/j.jcis.2016.09.041
177. Xiao, X., Zheng, S., Li, X., Zhang, G., Guo, X., Xue, H., & Pang, H. (2017). Facile synthesis of ultrathin Ni-MOF nanobelts for high-efficiency determination of glucose in human serum. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(26), 5234–5239. doi:10.1039/c7tb00180k
178. Chen, X., Liu, D., Cao, G., Tang, Y., & Wu, C. (2019). In Situ Synthesis of a Sandwich-like Graphene@ZIF-67 Heterostructure for Highly Sensitive Nonenzymatic Glucose Sensing in Human Serums. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11(9), 9374–9384. doi:10.1021/acsami.8b22478
179. Arul, P., Gowthaman, N. S. K., John, S. A., & Tominaga, M. (2020). Tunable electrochemical synthesis of 3D nucleated microparticles like Cu-BTC MOF-carbon nanotubes composite: Enzyme free ultrasensitive determination of glucose in a complex biological fluid. *Electrochimica Acta*, 136673. doi:10.1016/j.electacta.2020.136673
180. Li, Y., Xie, M., Zhang, X., Liu, Q., Lin, D., Xu, C., & Sun, X. (2019). Co-MOF nanosheet array: A high-performance electrochemical sensor for non-enzymatic glucose detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 278, 126-132. doi.org/10.1016/j.snb.2018.09.076
181. Karmakar, S., Kundu, S. K., Bandyopadhyay, S. K., Gangopadhyay, M., & Taki, G. S. (2020, October). Importance of transition metal modified graphene-based non-enzymatic blood glucose sensors. In *2020 4th International Conference on Electronics, Materials Engineering & Nano-Technology (IEMENTech)* (pp. 1-4). IEEE. doi: 10.1109/IEMENTech51367.2020.9270049
182. Kaur, B., Pandiyan, T., Satpati, B., & Srivastava, R. (2013). Simultaneous and sensitive determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid, and tryptophan with silver nanoparticles-decorated reduced graphene oxide modified electrode. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111, 97–106. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.05.023
183. Krishnamoorthy, K., Sudha, V., Kumar, S. M. S., & Thangamuthu, R. (2018). Simultaneous determination of dopamine and uric acid using copper oxide nano-rice

- modified electrode. *Journal of Alloys and Compounds*, 748, 338-347. doi.org/10.1016/j.jallcom.2018.03.118
184. Pan, Y., Zuo, J., Hou, Z., Huang, Y., & Huang, C. (2020). Preparation of electrochemical sensor based on zinc oxide nanoparticles for simultaneous determination of AA, DA, and UA. *Frontiers in chemistry*, 8, 592538. doi.org/10.3389/fchem.2020.592538
185. Sun, D., Zhao, Q., Tan, F., Wang, X., & Gao, J. (2012). Simultaneous detection of dopamine, uric acid, and ascorbic acid using SnO₂ nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes/carbon paste electrode. *Analytical Methods*, 4(10), 3283-3289. doi.org/10.1039/C2AY25401H
186. Thanh, T. S., Qui, P. T., Tu, N. T. T., Toan, T. T. T., Hoa, T. T. B., Son, L. V. T., & Khieu, D. Q. (2021). Electrochemical determination of uric acid in urine by using zeolite imidazolate framework-11 modified electrode. *Journal of Nanomaterials*, 2021, 1-13. doi.org/10.1155/2021/9914062
187. Tang, J., Jiang, S., Liu, Y., Zheng, S., Bai, L., Guo, J., & Wang, J. (2018). Electrochemical determination of dopamine and uric acid using a glassy carbon electrode modified with a composite consisting of a Co (II)-based metalorganic framework (ZIF-67) and graphene oxide. *Microchimica Acta*, 185, 1-11. doi.org/10.1007/s00604-018-3025-x
188. Wyantuti, S., Pratomo, U., Manullang, L. A., Hendrati, D., Hartati, Y. W., & Bahti, H. H. (2021). Development of differential pulse voltammetric method for determining samarium (III) through electroanalytical study of the metal ion in acetonitrile using Box–Behnken design. *Heliyon*, 7(4), e06602. doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06602
189. Frey, D. D., & Wang, H. (2006). Adaptive one-factor-at-a-time experimentation and expected value of improvement. *Technometrics*, 48(3), 418-431. doi.org/10.1198/004017006000000075
190. Madondo, N. I., & Chetty, M. (2022). Anaerobic co-digestion of sewage sludge and bio-based glycerol: Optimization of process variables using one-factor-at-a-time (OFAT) and Box-Behnken Design (BBD) techniques. *South African Journal of Chemical Engineering*, 40, 87-99. doi.org/10.1016/j.sajce.2022.02.003

191. Akbari, S., Mahmood, S. M., Tan, I. M., & Adeyemi, B. J. (2017). Evaluation of one factor at a time (OFAT) technique in viscosity modeling of polymer solution. *ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences*, 12(17), 4313-4319. doi.10.3923/jeasci.2017.4313.4319
192. Busan, R. C., Murphy, P. C., Hatke, D. B., & Simmons, B. M. (2021). Wind tunnel testing techniques for a tandem tilt-wing, distributed electric propulsion vtol aircraft. *In AIAA SciTech 2021 Forum* (p. 1189). doi.org/10.2514/6.2021-1189
193. Fisher, R. A. (1936). Design of experiments. *British Medical Journal*, 1(3923), 554.
194. N. Politis, S., Colombo, P., Colombo, G., & M. Rekkas, D. (2017). Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug development and industrial pharmacy*, 43(6), 889-901. doi.org/10.1080/03639045.2017.1291672
195. Lee, B. C. Y., Mahtab, M. S., Neo, T. H., Farooqi, I. H., & Khursheed, A. (2022). A comprehensive review of Design of experiment (DOE) for water and wastewater treatment application-Key concepts, methodology and contextualized application. *Journal of Water Process Engineering*, 47, 102673. doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102673
196. Pollard, T. D., & De La Cruz, E. M. (2013). Take advantage of time in your experiments: a guide to simple, informative kinetics assays. *Molecular biology of the cell*, 24(8), 1103-1110. doi.org/10.1091/mbc.e13-01-0030
197. Wu, L., Yick, K. L., Ng, S. P., & Yip, J. (2012). Application of the Box–Behnken design to the optimization of process parameters in foam cup molding. *Expert Systems with Applications*, 39(9), 8059-8065. doi.org/10.1016/j.eswa.2012.01.137
198. Rakić, T., Kasagić-Vujanović, I., Jovanović, M., Jančić-Stojanović, B., & Ivanović, D. (2014). Comparison of full factorial design, central composite design, and box-behnken design in chromatographic method development for the determination of fluconazole and its impurities. *Analytical Letters*, 47(8), 1334-1347. doi.org/10.1080/00032719.2013.867503
199. Ferreira, S. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., & Dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: An alternative

- for the optimization of analytical methods. *Analytica chimica acta*, 597(2), 179-186. doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011
200. Guzmán, M. F., Mendoza Huizar, L. H., Galán Vidal, C. A., Morales, G. R., & Álvarez Romero, G. A. (2019). A Box-Behnken Optimized Methodology for the Quantification of Diclofenac using a Carbon Paste-Multiwalled Carbon Nanotubes Electrode. *Current Analytical Chemistry*, 15(3), 294-304. doi.org/10.2174/1573411014666180423151749
201. Weissman, S. A., & Anderson, N. G. (2015). Design of experiments (DoE) and process optimization. A review of recent publications. *Organic Process Research & Development*, 19(11), 1605-1633. doi.org/10.1021/op500169m
202. Franceschini, G., & Macchietto, S. (2008). Model-based design of experiments for parameter precision: State of the art. *Chemical Engineering Science*, 63(19), 4846-4872. doi.org/10.1016/j.ces.2007.11.034
203. Li, M., Feng, C., Zhang, Z., Chen, R., Xue, Q., Gao, C., & Sugiura, N. (2010). Optimization of process parameters for electrochemical nitrate removal using Box-Behnken design. *Electrochimica Acta*, 56(1), 265-270. doi.org/10.1016/j.electacta.2010.08.085
204. Yu, X. L., & He, Y. (2017). Application of Box-Behnken designs in parameters optimization of differential pulse anodic stripping voltammetry for lead (II) determination in two electrolytes. *Scientific Reports*, 7(1), 1-8. doi.org/10.1038/s41598-017-03030-2
205. Qiu, P., Cui, M., Kang, K., Park, B., Son, Y., Khim, E., & Khim, J. (2014). Application of Box-Behnken design with response surface methodology for modeling and optimizing ultrasonic oxidation of arsenite with H₂O₂. *Open Chemistry*, 12(2), 164-172. doi.org/10.2478/s11532-013-0360-y
206. Takele, A., Palacios-Santander, J. M., & Palma, M. (2022). A New Electrochemical Method to Determine Tryptophan in Fruit Juices: Development and Validation. *Foods*, 11(14), 2149. doi.org/10.3390/foods11142149
207. Faura, G., González-Calabuig, A., & del Valle, M. (2016). Analysis of amino acid mixtures by voltammetric electronic tongues and artificial neural networks. *Electroanalysis*, 28(8), 1894-1900. doi.org/10.1002/elan.201600055

208. José Jara-Palacios, M., Luisa Escudero-Gilete, M., Miguel Hernández-Hierro, J., Heredia, F. J., & Hernanz, D. (2017). Cyclic voltammetry to evaluate the antioxidant potential in winemaking by-products. *Talanta*, 165, 211–215. doi:10.1016/j.talanta.2016.12.058
209. de Morais, T. C. B., Rodrigues, D. R., Souto, U. T. D. C. P., & Lemos, S. G. (2019). A simple voltammetric electronic tongue for the analysis of coffee adulterations. *Food chemistry*, 273, 31-38. doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.136
210. Górski, Ł., Kowalcze, M., & Jakubowska, M. (2019). Classification of six herbal bioactive compositions employing LAPV and PLS-DA. *Journal of Chemometrics*, 33(4), e3112. https://doi.org/10.1002/cem.3112
211. Alimi, A., Assaker, I. B., Mozaryn, J., Ávila-Brandé, D., Castillo-Martínez, E., & Chtourou, R. (2022). Electrochemical synthesis of MnO₂/NiO/ZnO trijunction coated stainless steel substrate as a supercapacitor electrode and cyclic voltammetry behavior modeling using artificial neural network. *International Journal of Energy Research*, 46(12), 17163-17179. https://doi.org/10.1002/er.8380
212. Dongale, T. D., Jadhav, P. R., Navathe, G. J., Kim, J. H., Karanjkar, M. M., & Patil, P. S. (2015). Development of nano fiber MnO₂ thin film electrode and cyclic voltammetry behavior modeling using artificial neural network for supercapacitor application. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 36, 43–48. doi:10.1016/j.mssp.2015.02.084
213. Laguarda-Miro, N., Ferreira, F. W., García-Breijo, E., Ibáñez-Civera, J., Gil-Sánchez, L., & Garrigues-Baixauli, J. (2012). Glyphosate detection by voltammetric techniques. A comparison between statistical methods and an artificial neural network. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 171, 528-536. doi.org/10.1016/j.snb.2012.05.025
214. Zhao, G., Wang, H., & Liu, G. (2017). Direct quantification of Cd²⁺ in the presence of Cu²⁺ by a combination of anodic stripping voltammetry using a Bi-film-modified glassy carbon electrode and an artificial neural network. *Sensors*, 17(7), 1558. doi.org/10.3390/s17071558
215. Alimi, A., Assaker, I. B., Mozaryn, J., Ávila-Brandé, D., Castillo-Martínez, E., & Chtourou, R. (2022). Electrochemical synthesis of MnO₂/NiO/ZnO trijunction

- coated stainless steel substrate as a supercapacitor electrode and cyclic voltammetry behavior modeling using artificial neural network. *International Journal of Energy Research*, 46(12), 17163-17179. doi.org/10.1002/er.8380
216. Bonet-San-Emeterio, M., González-Calabuig, A., & del Valle, M. (2019). Artificial Neural Networks for the Resolution of Dopamine and Serotonin Complex Mixtures Using a Graphene-Modified Carbon Electrode. *Electroanalysis*, 31(2), 390-397. doi.org/10.1002/elan.201800525
217. Cipri, A., Schulz, C., Ludwig, R., Gorton, L., & Del Valle, M. (2016). A novel bio-electronic tongue using different cellobiose dehydrogenases to resolve mixtures of various sugars and interfering analytes. *Biosensors and Bioelectronics*, 79, 515-521. doi.org/10.1016/j.bios.2015.12.069
218. Yehia, A. M., & Mohamed, H. M. (2016). Chemometrics resolution and quantification power evaluation: application on pharmaceutical quaternary mixture of Paracetamol, Guaifenesin, Phenylephrine and p-aminophenol. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 152, 491-500. doi.org/10.1016/j.saa.2015.07.101
219. Faura, G., González-Calabuig, A., & del Valle, M. (2016). Analysis of amino acid mixtures by voltammetric electronic tongues and artificial neural networks. *Electroanalysis*, 28(8), 1894-1900. doi.org/10.1002/elan.201600055
220. Kudr, J., Nguyen, H. V., Gumulec, J., Nejd, L., Blazkova, I., Ruttikay-Nedecky, B., ... & Kizek, R. (2014). Simultaneous automatic electrochemical detection of zinc, cadmium, copper and lead ions in environmental samples using a thin-film mercury electrode and an artificial neural network. *Sensors*, 15(1), 592-610. doi.org/10.3390/s150100592
221. González-Calabuig, A., Guerrero, D., Serrano, N., & del Valle, M. (2016). Simultaneous Voltammetric Determination of Heavy Metals by Use of Crown Ether-modified Electrodes and Chemometrics. *Electroanalysis*, 28(4), 663-670. doi.org/10.1002/elan.201500512
222. Jiang, L., & Zheng, K. (2023). Towards the intelligent antioxidant activity evaluation of green tea products during storage: A joint cyclic voltammetry and

- machine learning study. *Food Control*, 109660. doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109660
223. Schaumloffel, L. D. S., Bolognese Fernandes, P. R., Sartori Piatnicki, C. M., & Gutterres, M. (2019). A chemometric-assisted voltammetric method for simultaneous determination of four antioxidants in biodiesel samples. *Energy & Fuels*, 34(1), 412-418. doi.org/10.1021/acs.energyfuels.9b02810
224. Moghadam, M. R., Dadfarnia, S., Shabani, A. M. H., & Shahbazikhah, P. (2011). Chemometric-assisted kinetic–spectrophotometric method for simultaneous determination of ascorbic acid, uric acid, and dopamine. *Analytical biochemistry*, 410(2), 289-295. doi.org/10.1016/j.ab.2010.11.007
225. Castro, W., Oblitas, J., Santa-Cruz, R., & Avila-George, H. (2017). Multilayer perceptron architecture optimization using parallel computing techniques. *PloS one*, 12(12), e0189369. doi.org/10.1371/journal.pone.0189369
226. Curteanu, S., & Cartwright, H. (2011). Neural networks applied in chemistry. I. Determination of the optimal topology of multilayer perceptron neural networks. *Journal of Chemometrics*, 25(10), 527-549. doi.org/10.1002/cem.1401
227. Yang, F., Moayedi, H., & Mosavi, A. (2021). Predicting the degree of dissolved oxygen using three types of multi-layer perceptron-based artificial neural networks. *Sustainability*, 13(17), 9898. doi.org/10.3390/su13179898
228. Gevrey, M., Dimopoulos, I., & Lek, S. (2003). Review and comparison of methods to study the contribution of variables in artificial neural network models. *Ecological modelling*, 160(3), 249-264. doi.org/10.1016/S0304-3800(02)00257-0
229. Gorr, W. L., Nagin, D., & Szczypula, J. (1994). Comparative study of artificial neural network and statistical models for predicting student grade point averages. *International Journal of Forecasting*, 10(1), 17-34. doi.org/10.1016/0169-2070(94)90046-9
230. Fidan, S., Oktay, H., Polat, S., & Ozturk, S. (2019). An artificial neural network model to predict the thermal properties of concrete using different neurons and activation functions. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019. doi.org/10.1155/2019/3831813

231. Ertuğrul, Ö. F. (2018). A novel type of activation function in artificial neural networks: Trained activation function. *Neural Networks*, 99, 148-157. doi.org/10.1016/j.neunet.2018.01.007
232. Ariza-Avidad, M., Cuellar, M. P., Salinas-Castillo, A., Pegalajar, M. C., Vuković, J., & Capitan-Vallvey, L. F. (2013). Feasibility of the use of disposable optical tongue based on neural networks for heavy metal identification and determination. *Analytica Chimica Acta*, 783, 56-64. doi.org/10.1016/j.aca.2013.04.035
233. Olivieri, A. C., Faber, N. M., Ferré, J., Boqué, R., Kalivas, J. H., & Mark, H. (2006). Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 78(3), 633-661. doi.org/10.1351/pac200678030633
234. Olivieri, A. C. (2015). Practical guidelines for reporting results in single-and multi-component analytical calibration: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 868, 10-22. doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.017
235. Reinsch, H., & Stock, N. (2013). Formation and characterisation of Mn-MIL-100. *CrystEngComm*, 15(3), 544-550. DOI <https://doi.org/10.1039/C2CE26436F>
236. Mehta, A. C. (1989). The validation criteria for analytical methods used in pharmacy practice research. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 14(6), 465-473. doi.org/10.1111/j.1365-2710.1989.tb00272.x
237. Rahmani, P. (2011). The relationship between self-esteem, achievement goals and academic achievement among the primary school students. *Procedia-Social and Behavioral Sciences*, 29, 803-808. doi.org/10.1016/j.sbspro.2011.11.308
238. Dini, I., Seccia, S., Senatore, A., Coppola, D., & Morelli, E. (2020). Development and validation of an analytical method for total polyphenols quantification in extra virgin olive oils. *Food Analytical Methods*, 13, 457-464. doi.org/10.1007/s12161-019-01657-7
239. Aguilar-Lira, G. Y., Gutiérrez-Salgado, J. M., Rojas-Hernández, A., Rodríguez-Ávila, J. A., Páez-Hernández, M. E., & Álvarez-Romero, G. A. (2017). Artificial neural network for the voltamperometric quantification of diclofenac in presence of other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and some commercial

- excipients. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 801, 527-535. doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.08.029
240. Chen, H. I. H., Jin, Y., Huang, Y., & Chen, Y. (2016). Detection of high variability in gene expression from single-cell RNA-seq profiling. *BMC genomics*, 17, 119-128. doi.org/10.1186/s12864-016-2897-6
241. Laguarda-Miro, N., Ferreira, F. W., García-Breijo, E., Ibáñez-Civera, J., Gil-Sánchez, L., & Garrigues-Baixauli, J. (2012). Glyphosate detection by voltammetric techniques. A comparison between statistical methods and an artificial neural network. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 171, 528-536. doi.org/10.1016/j.snb.2012.05.025
242. Paneiro, G., & Rafael, M. (2021). Artificial neural network with a cross-validation approach to blast-induced ground vibration propagation modeling. *Underground Space*, 6(3), 281-289. doi.org/10.1016/j.undsp.2020.03.002
243. Chitravathi, S., Swamy, B. K., Mamatha, G. P., & Chandrashekar, B. N. (2012). Electrocatalytic oxidation of tyrosine at poly (threonine)-film modified carbon paste electrode and its voltammetric determination in real samples. *Journal of Molecular Liquids*, 172, 130-135. doi.org/10.1016/j.molliq.2012.03.022
244. Zandi, O., & Hamann, T. W. (2016). Determination of photoelectrochemical water oxidation intermediates on haematite electrode surfaces using operando infrared spectroscopy. *Nature chemistry*, 8(8), 778-783. doi.org/10.1038/nchem.2557
245. Kamiya, K., Kuwabara, A., Harada, T., & Nakanishi, S. (2019). Electrochemical formation of Fe (IV)= O derived from H₂O₂ on a hematite electrode as an active catalytic site for selective hydrocarbon oxidation reactions. *ChemPhysChem*, 20(5), 648-650. doi.org/10.1002/cphc.201801207
246. Ahmad, M. S. (2018). Novel one pot synthesis of alkaline-reduced iron oxide/graphene nanocomposites for amperometric non-enzymatic glucose sensor. *International Journal of Electrochemical Science*, 13, 9200-9213. doi: 10.20964/2018.09.09

247. Yang, L., Ren, X., Tang, F., & Zhang, L. (2009). A practical glucose biosensor based on Fe₃O₄ nanoparticles and chitosan/nafion composite film. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(4), 889-895. doi.org/10.1016/j.bios.2009.09.002
248. Sanaeifar, N., Rabiee, M., Abdolrahim, M., Tahriri, M., Vashae, D., & Tayebi, L. (2017). A novel electrochemical biosensor based on Fe₃O₄ nanoparticles-polyvinyl alcohol composite for sensitive detection of glucose. *Analytical Biochemistry*, 519, 19-26. doi.org/10.1016/j.ab.2016.12.006
249. Cao, X., & Wang, N. (2011). A novel non-enzymatic glucose sensor modified with Fe₂O₃ nanowire arrays. *Analyst*, 136(20), 4241-4246. doi.org/10.1039/C1AN15367F
250. Chen, Y., Zhang, H., Xue, H., Hu, X., Wang, G., & Wang, C. (2014). Construction of a non-enzymatic glucose sensor based on copolymer P4VP-co-PAN and Fe₂O₃ nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 35, 420-425. doi.org/10.1016/j.msec.2013.11.030
251. Xia, C., & Ning, W. (2010). A novel non-enzymatic electrochemical glucose sensor modified with FeOOH nanowire. *Electrochemistry Communications*, 12(11), 1581-1584. doi.org/10.1016/j.elecom.2010.09.002
252. Xu, J., Sun, Y., & Zhang, J. (2020). Solvothermal synthesis of Fe₃O₄ nanospheres for high-performance electrochemical non-enzymatic glucose sensor. *Scientific Reports*, 10(1), 1-8. doi.org/10.1038/s41598-020-73090-4
253. Vennila, P., Yoo, D. J., & Kim, A. R. (2017). Ni-Co/Fe₃O₄ flower-like nanocomposite for the highly sensitive and selective enzyme free glucose sensor applications. *Journal of Alloys and Compounds*, 703, 633-642. doi.org/10.1016/j.jallcom.2017.01.044
254. Malerz, S., Mudryk, K., Tomaník, L., Stemer, D., Hergenbahn, U., Buttersack, T., ... & Winter, B. (2021). Following in Emil Fischer's Footsteps: A Site-Selective Probe of Glucose Acid-Base Chemistry. *The Journal of Physical Chemistry A*, 125(32), 6881-6892. doi.org/10.1021/acs.jpca.1c04695
255. Rao, C. P., Geetha, K., & Raghavan, M. S. S. (1994). Fe (III) complexes of D-glucose and D-fructose. *BioMetals*, 7, 25-29. doi.org/10.1007/BF00205190

256. Guan, J.-F., Huang, Z.-N., Zou, J., Jiang, X.-Y., Peng, D.-M., & Yu, J.-G. (2020). A sensitive non-enzymatic electrochemical sensor based on acicular manganese dioxide modified graphene nanosheets composite for hydrogen peroxide detection. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 110123. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.110123
257. Dong, S., Niu, H., Sun, L., Zhang, S., Wu, D., Yang, Z., & Xiang, M. (2022). Highly dense Ni-MOF nanoflake arrays supported on conductive graphene/carbon fiber substrate as flexible microelectrode for electrochemical sensing of glucose. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 911, 116219. doi.org/10.1016/j.jelechem.2022.116219
258. Gonçalves, J. M., Martins, P. R., Rocha, D. P., Matias, T. A., Juliao, M. S., Munoz, R. A., & Angnes, L. (2021). Recent trends and perspectives in electrochemical sensors based on MOF-derived materials. *Journal of Materials Chemistry C*, 9(28), 8718-8745. doi.org/10.1039/D1TC02025K
259. Arif, D., Hussain, Z., Sohail, M., Liaqat, M. A., Khan, M. A., & Noor, T. (2020). A non-enzymatic electrochemical sensor for glucose detection based on Ag@TiO₂@ metal-organic framework (ZIF-67) nanocomposite. *Frontiers in Chemistry*, 8, 573510. doi.org/10.3389/fchem.2020.573510
260. Xiao, X., Zheng, S., Li, X., Zhang, G., Guo, X., Xue, H., & Pang, H. (2017). Facile synthesis of ultrathin Ni-MOF nanobelts for high-efficiency determination of glucose in human serum. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(26), 5234-5239. doi: 10.1039/C7TB00180K
261. Shi, L., Zhu, X., Liu, T., Zhao, H., & Lan, M. (2016). Encapsulating Cu nanoparticles into metal-organic frameworks for nonenzymatic glucose sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 227, 583-590. doi:10.1016/j.snb.2015.12.092
262. Ranganathan, S., Lee, S. M., Lee, J., & Chang, S. C. (2017). Electrochemical Non-Enzymatic Glucose Sensor based on Hexagonal Boron Nitride with Metal-Organic Framework Composite. *Journal of Sensor Science and Technology*, 26(6), 379-385. doi: 10.5369/JSST.2017.26.6.379
263. Chen, C., Zhong, Y., Cheng, S., Huang, Y., Li, T., Shi, T., ... Tang, Z. (2020). In Situ Fabrication of Porous Nanostructures Derived from Bimetal-Organic

- Frameworks for Highly Sensitive Non-Enzymatic Glucose Sensors. *Journal of The Electrochemical Society*, 167(2), 027531. doi:10.1149/1945-7111/ab6b05
264. Ponnusamy, R.; Venkatesan, R.; Kandasamy, M.; Chakraborty, B.; Rout, C. S. MnO₂ polymorph selection for non-enzymatic glucose detection: An integrated experimental and density functional theory investigation. *Applied Surface Science* **2019**, 487, 1033-1042. doi:10.1016/j.apsusc.2019.05.190
265. Tran, H. D., Le, A. H., & Tran, U. P. (2021). Preparation of Electrode Material Based to Bismuth Oxide-Attached Multiwalled Carbon Nanotubes for Lead (II) Ion Determination. *Journal of Nanomaterials*, 2021, 1-12.
266. Wang, H. W., Hu, Z. A., Chang, Y. Q., Chen, Y. L., Lei, Z. Q., Zhang, Z. Y., & Yang, Y. Y. (2010). Facile solvothermal synthesis of a graphene nanosheet–bismuth oxide composite and its electrochemical characteristics. *Electrochimica Acta*, 55(28), 8974-8980. doi.org/10.1016/j.electacta.2010.08.048
267. Adeosun, W. A., Asiri, A. M., Marwani, H. M., & Rahman, M. M. (2020). Enzymeless electrocatalytic detection of uric acid using polydopamine/polypyrrole copolymeric film. *ChemistrySelect*, 5(1), 156-164. doi.org/10.1002/slct.201903628
268. Murugan, N., Chan-Park, M. B., & Sundramoorthy, A. K. (2019). Electrochemical detection of uric acid on exfoliated nanosheets of graphitic-like carbon nitride (g-C₃N₄) based sensor. *Journal of the electrochemical Society*, 166(9), B3163-B3170. Doi.10.1149/2.0261909jes
269. Shetti, N. P., Malode, S. J., Malladi, R. S., Nargund, S. L., Shukla, S. S., & Aminabhavi, T. M. (2019). Electrochemical detection and degradation of textile dye Congo red at graphene oxide modified electrode. *Microchemical Journal*, 146, 387-392. doi.org/10.1016/j.microc.2019.01.033
270. Tang, J., Jiang, S., Liu, Y., Zheng, S., Bai, L., Guo, J., & Wang, J. (2018). Electrochemical determination of dopamine and uric acid using a glassy carbon electrode modified with a composite consisting of a Co (II)-based metalorganic framework (ZIF-67) and graphene oxide. *Microchimica Acta*, 185, 1-11. doi.org/10.1007/s00604-018-3025-x

271. Hussain, M. M., Rahman, M. M., Asiri, A. M., & Awual, M. R. (2016). Non-enzymatic simultaneous detection of L-glutamic acid and uric acid using mesoporous Co_3O_4 nanosheets. *RSC advances*, 6(84), 80511-80521. DOI: 10.1039/C6RA12256F
272. Iranmanesh, T., Foroughi, M. M., Jahani, S., Zandi, M. S., & Nadiki, H. H. (2020). Green and facile microwave solvent-free synthesis of CeO_2 nanoparticle-decorated CNTs as a quadruplet electrochemical platform for ultrasensitive and simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine, uric acid and acetaminophen. *Talanta*, 207, 120318. doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120318
273. Suresh, R., Giribabu, K., Manigandan, R., Stephen, A., & Narayanan, V. (2014). Fabrication of Ni- Fe_2O_3 magnetic nanorods and application to the detection of uric acid. *RSC Advances*, 4(33), 17146-17155. doi: 10.1039/C4RA00725E
274. Pan, Y., Zuo, J., Hou, Z., Huang, Y., & Huang, C. (2020). Preparation of electrochemical sensor based on zinc oxide nanoparticles for simultaneous determination of AA, DA, and UA. *Frontiers in chemistry*, 8, 592538. doi.org/10.3389/fchem.2020.592538
275. Jahani, S., & Beitollahi, H. (2016). Selective detection of dopamine in the presence of uric acid using NiO nanoparticles decorated on graphene nanosheets modified screen-printed electrodes. *Electroanalysis*, 28(9), 2022-2028. doi.org/10.1002/elan.201501136
276. Mahmoudian, M. R., Basirun, W. J., Sookhajian, M., Woi, P. M., Zalnezhad, E., Hazarkhani, H., & Alias, Y. (2019). Synthesis and characterization of α - Fe_2O_3 /polyaniline nanotube composite as electrochemical sensor for uric acid detection. *Advanced Powder Technology*, 30(2), 384-392. doi.org/10.1016/j.appt.2018.11.015
277. Ghanbari, K., & Hajheidari, N. (2015). ZnO-Cu_xO/polypyrrole nanocomposite modified electrode for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid. *Analytical Biochemistry*, 473, 53-62. doi.org/10.1016/j.ab.2014.12.013
278. Han, J., Wang, Z., An, S., Dong, P., Xie, G., & Chen, S. (2017). Facile synthesis of perylenetetracarboxylic acid modified bismuth@ carbon nanostructures and its enhanced sensitivity for selective electrochemical determination of three

biomolecules. *Journal of The Electrochemical Society*, 164(12), B553. Doi. 10.1149/2.1371712jes

279. Sinha, G. N., Subramanyam, P., Sivaramakrishna, V., & Subrahmanyam, C. (2021). Electrodeposited copper bismuth oxide as a low-cost, non-enzymatic electrochemical sensor for sensitive detection of uric acid and hydrogen peroxide. *Inorganic Chemistry Communications*, 129, 108627. doi.org/10.1016/j.inoche.2021.108627
280. Madagalam, M., Catania, F., Bartoli, M., Tagliaferro, A., & Carrara, S. (2021). Nanostructured Bismuth Electrodes for Non-Enzymatic Paracetamol Sensing: Development, Testing, and Computational Approach. *Chemistry Proceedings*, 5(1), 33. doi.org/10.3390/CSAC2021-10427