



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA  
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

## “EVALUACIÓN DE UN SENSOR NO ENZIMÁTICO CON PELÍCULA DE PLATA PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA”

TESIS  
PARA OBTENER EL TÍTULO  
LICENCIADA EN QUÍMICA

PRESENTA:

**MARÍA GUADALUPE MORENO BAUTISTA**

DIRECTOR

Dr. Carlos Andrés Galán Vidal



MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO

MARZO 2020



Mineral de la Reforma, Hgo., a 3 de marzo de 2020

**Número de control:** ICBI-D/398/2020  
**Asunto:** Autorización de impresión.

**M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO**  
**DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH**

Por este medio le comunico que el Jurado asignado a la Pasante de la Licenciatura en Química María Guadalupe Moreno Bautista, quien presenta el trabajo de titulación "Evaluación de un sensor no enzimático con película de plata para la determinación de glucosa" después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación firman de conformidad los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE: Dra. María Elena Páez Hernández  
PRIMER VOCAL: Dr. Carlos Andrés Galán Vidal  
SECRETARIO: Dr. José Antonio Rodríguez Ávila  
SUPLENTE: Dra. Irma Pérez Silva

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente  
"Amor, Orden y Progreso"

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval  
Director del ICBI

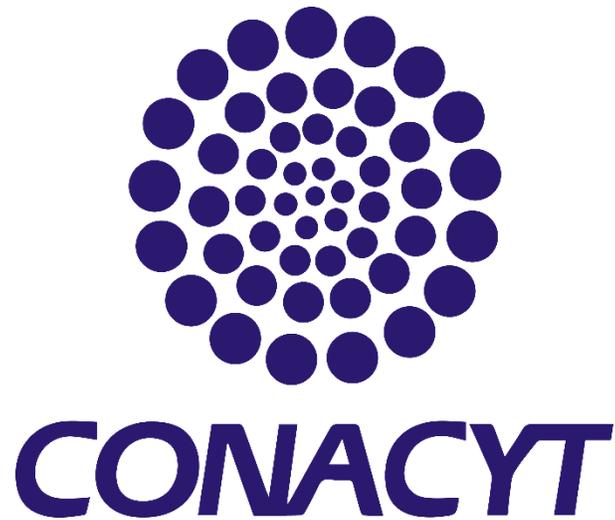


OAAS/SEPC



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. 2231 Fax 2109  
direccion\_icbi@uaeh.edu.mx

[www.uaeh.edu.mx](http://www.uaeh.edu.mx)



El presente trabajo se ha realizado gracias al financiamiento otorgado por el *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)*, como parte del proyecto: **DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA DE GLUCOSA, COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS (CLAVE CB-2014-242677)**

De igual manera agradezco al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar los estudios nivel licenciatura (No. 29411).

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis padres Teresa Bautista y Roberto Moreno y mi hermano Fernando, por su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida, por su amor, por formarme como persona, por su comprensión y el esfuerzo que realizaron para no limitarme en mis aspiraciones, por la motivación para esforzarme día tras día. Mamá gracias por ser mi mayor ejemplo de esfuerzo, dedicación y trabajo, gracias por confiar en mí y por ser mi mayor motivo e inspiración en la vida.

A la Dra. Ma. Elena Páez y al Dr. Carlos Galán por la confianza depositada en mí para la realización de este proyecto, por abrirme las puertas de laboratorio y compartirme sus conocimientos.

A la Dra. Irmita, gracias por el apoyo profesional y moral, y sobre todo por la paciencia.

A Jess y Mariana por su amistad incondicional, amistad que ha perdurado a través de los años y aunque tomamos caminos diferentes, nunca ha faltado un buen momento para reencontrarnos.

A Alain y Vivian, mi eterno equipo de laboratorio, gracias por hacer más ameno este camino, mucha fiesta, muchos buenos momentos, algunos no tanto, pero nunca faltaron las risas, me quedo con muy gratos recuerdo de ustedes. Amigo, gracias infinitas por tu amistad.

A Jorge por convertirte en un gran apoyo, gracias por la motivación y porque siempre que necesitaba ahí estabas, gracias por tu cariño y compañía.

Gracias a Dios.

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>III</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>V</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2 ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
2.1 GLUCOSA.....	3
2.2 MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA Y DETECCIÓN DE GLUCOSA .....	5
2.2.1 <i>Métodos Espectrofotométricos</i> .....	5
2.2.1.1 Glucosa oxidasa (GOx) .....	5
2.2.1.2 Hexoquinasa .....	6
2.2.2 <i>Métodos Cromatográficos</i> .....	6
2.2.2.1 Cromatografía Iónica.....	6
2.2.2.2 Cromatografía de Fase Inversa.....	7
2.2.2.3 Cromatografía de Exclusión de Tamaños .....	7
2.2.2.4 Cromatografía de Interacción Hidrofílica .....	7
2.2.3 <i>Métodos Electroquímicos</i> .....	7
2.2.3.1.1 Biosensores Amperométricos de Glucosa.....	8
2.2.3.1.2 Biosensores de Primera Generación .....	9
2.2.3.1.3 Biosensores de Segunda Generación .....	10
2.2.3.1.4 Biosensores de Tercera Generación .....	11
2.2.4 <i>Otros Métodos</i> .....	11
2.2.4.1 Electroodos no Enzimáticos de Óxidos Metálicos .....	12
2.2.4.2 Sensores no enzimáticos de Platino .....	12
2.2.4.3 Sensores no enzimáticos de Oro .....	13
2.2.4.4 Sensores no enzimáticos de Cobre.....	14
2.2.4.5 Sensores no enzimáticos de Plata .....	15
<b>3 JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>17</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
4.1 OBJETIVO GENERAL .....	18
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>19</b>
5.1 REACTIVOS Y SOLUCIONES .....	19
5.2 INSTRUMENTACIÓN.....	19
5.3 ELECTRODEPÓSITO DE PLATA .....	19
5.4 CARACTERIZACIÓN VOLTAMPEROMÉTRICA .....	20
5.5 ESTUDIOS CRONOAMPEROMÉTRICOS .....	20
5.6 EVALUACIÓN DE INTERFERENCIAS .....	20

5.7 DETERMINACIÓN DE GLUCOSA EN MUESTRAS REALES.....	21
<b>6 RESULTADOS Y DISCUSIONES .....</b>	<b>22</b>
6.1 CARACTERIZACIÓN VOLTAMPEROMÉTRICA .....	22
6.1.1 <i>Caracterización del electrodepósito de plata sobre el electrodo de carbón vítreo y de su respuesta a glucosa mediante voltamperometría cíclica.</i> .....	22
6.1.2 <i>Evaluación de la variación de la intensidad de señal respecto al tiempo.</i>	24
6.1.3 <i>Reducción del rango de potencial de trabajo para la detección de glucosa.</i>	25
6.1.4 <i>Evaluación de la velocidad del barrido de potencial durante el electrodepósito de plata sobre el electrodo de carbón vítreo</i> .....	27
6.1.5 <i>Cambio de sentido anódico a catódico en el electrodepósito de plata sobre el electrodo de carbón vítreo.</i> .....	29
6.2 ESTUDIOS CRONOAMPEROMÉTRICOS. ....	30
6.2.1 <i>Optimización del pH de trabajo</i> .....	30
6.2.2 <i>Estudio de la variación de concentración de AgNO<sub>3</sub> en el electrodepósito sobre el electrodo de carbón vítreo.</i> .....	33
6.2.3 <i>Evaluación del potencial de electrodepósito</i> .....	36
6.2.4 <i>Evaluación de tiempo de electrodepósito y preoxidación.</i> .....	37
6.2.5 <i>Evaluación de la reproducibilidad.</i> .....	39
6.2.6 <i>Intervalo de concentración y parámetros analíticos</i> .....	40
6.2.7 <i>Evaluación de Interferencias</i> .....	41
6.2.8 <i>Cuantificación de glucosa en muestras comerciales.</i> .....	43
6.2.8.1 <i>Electrolito comercial (Muestra 1).</i> .....	43
6.2.8.2 <i>Suero glucosado al 5% (Muestra 2).</i> .....	44
<b>7 CONCLUSIONES .....</b>	<b>46</b>
<b>8 ANEXO .....</b>	<b>47</b>
<b>9 REFERENCIAS .....</b>	<b>49</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Enantiómeros de la glucosa.....	3
Figura 2. Anómeros de la $\alpha$ -D-glucosa en solución.....	4
Figura 3. Esquema general de un sensor electroquímico.....	8
Figura 4. Resumen de mecanismos de la oxidación de glucosa en las diferentes generaciones de biosensores.....	10
Figura 5. Esquema de electrodeposición de plata y de oxidación del electrodeposito.....	19
Figura 6. Electrodeposición de Ag sobre un electrodo de carbón vítreo, primer ciclo (línea negra) y décimo ciclo (línea roja punteada) a $50 \text{ mV s}^{-1}$ .....	22
Figura 7. Voltamperogramas cíclicos del electrodo de carbón vítreo con electrodeposito de plata en $\text{NaOH } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ (línea negra); $\text{NaOH } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ con glucosa $1 \text{ mmol L}^{-1}$ (línea punteada roja). Segundo ciclo.....	23
Figura 8. Voltamperogramas cíclicos de adiciones sucesivas de glucosa a $50 \text{ mV s}^{-1}$ de un electrodo de carbón vítreo con electrodeposito de plata (segundo ciclo), b) Ampliación de la zona de oxidación de glucosa.....	24
Figura 9. a) Voltamperograma cíclico de lecturas de glucosa respecto al tiempo a $50 \text{ mV s}^{-1}$ de un electrodo de carbón vítreo con electrodeposito de plata, b) Zona de oxidación de la glucosa.....	24
Figura 10. Voltamperogramas cíclicos de un electrodo de plata de $0.90$ a $-0.60 \text{ V}$ , con lecturas de glucosa respecto al tiempo a $50 \text{ mV s}^{-1}$ en $\text{NaOH } 0.1 \text{ mmol L}^{-1}$ .....	25
Figura 11. Voltamperograma cíclico de un electrodo de plata de $0.45$ a $0.70 \text{ V}$ , con incremento de concentración de glucosa y comportamiento respecto al tiempo ( $50 \text{ mV s}^{-1}$ en $\text{NaOH } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ).....	26
Figura 12. Voltamperograma cíclico de un electrodeposito de plata sobre un electrodo de carbón vítreo en un rango de potencial de $0.45$ a $0.90 \text{ V}$ , con incremento de concentración de glucosa y comportamiento respecto al tiempo ( $50 \text{ mV s}^{-1}$ en $\text{NaOH } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ).....	26
Figura 13. Observación de crecimiento 3D de óxido de plata sobre la superficie del electrodo de trabajo y desprendimiento de sólido del electrodo.....	27
Figura 14. Voltamperograma cíclico de un electrodeposito de plata sobre un electrodo de carbón vítreo con incremento de concentración de glucosa y comportamiento respecto al tiempo ( $5 \text{ mV s}^{-1}$ en $\text{NaOH } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ).....	27
Figura 15. Voltamperograma cíclico de un electrodeposito de plata sobre un electrodo de carbón vítreo con incremento de concentración de glucosa y comportamiento respecto al tiempo ( $10 \text{ mV s}^{-1}$ en $\text{NaOH } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ).....	28
Figura 16. Voltamperograma cíclico de un electrodeposito de plata sobre un electrodo de carbón vítreo con incremento de concentración de glucosa y comportamiento respecto al tiempo ( $20 \text{ mV s}^{-1}$ en $\text{NaOH } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ).....	28
Figura 17. Voltamperograma cíclico de un electrodeposito de plata sobre un electrodo de carbón vítreo con incremento de concentración de glucosa y comportamiento respecto al tiempo a $10 \text{ mV s}^{-1}$ .....	29

Figura 18. Voltamperograma del electrodepósito de Ag sobre un electrodo de carbón vítreo, primer ciclo a $10 \text{ mV s}^{-1}$ .....	29
Figura 19. Voltamperograma cíclico de un electrodepósito de plata sobre un electrodo de carbón vítreo con incremento de concentración de glucosa a $10 \text{ mV s}^{-1}$ .....	30
Figura 20. Voltamperograma cíclico que muestra la variación respecto al tiempo de la intensidad de la señal correspondiente a la oxidación de glucosa.....	30
Figura 21. Registro cronoamperométrico de un electrodo de carbón vítreo con electrodepósito de plata para adiciones de glucosa $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ , a pH 12. ....	31
Figura 22. Registro cronoamperométrico de un electrodo de carbón vítreo con electrodepósito de plata para adiciones de glucosa $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ , a pH 13. ....	31
Figura 23. Registro cronoamperométrico de un electrodo de carbón vítreo con electrodepósito de plata para adiciones de glucosa $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ , a pH 14. ....	32
Figura 24. Diagrama de Existencia Predominio para el sistema $\text{pAg}'$ vs pH (consultar datos en anexo). ....	33
Figura 25. Electrodepósito de Ag sobre un electrodo de carbón vítreo, primer ciclo a $10 \text{ mV s}^{-1}$ con $\text{AgNO}_3 \ 5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	34
Figura 26. Electrodepósito de Ag sobre un electrodo de carbón vítreo, primer ciclo a $10 \text{ mV s}^{-1}$ con $\text{AgNO}_3 \ 1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ .....	34
Figura 27. Curvas de calibrado correspondiente los registros cronoamperométricos realizados con electrodepósito de $\text{AgNO}_3 \ 1 \times 10^{-2} \text{ M}$ . ....	35
Figura 28. Curvas de calibrado correspondiente los registros cronoamperométricos realizados con electrodepósito de $\text{AgNO}_3 \ 5 \times 10^{-3} \text{ M}$ . ....	35
Figura 29. Curva de calibrado de Glucosa sobre un electrodo de carbón vítreo con electrodepósito de plata. ....	41
Figura 30. Efecto de las interferencias en la cuantificación de glucosa con electrodo de carbón vítreo con electrodepósito de plata, a) concentraciones iguales de glucosa e interferentes, b) concentración de glucosa diez veces mayor que la concentración de interferentes y c) concentración de glucosa diez veces menor que la concentración de interferentes. ....	42
Figura 31. a) Registro cronoamperométrico para una adición de $0.1 \text{ mL}$ de dilución $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ de muestra 1 en $10 \text{ mL}$ de $\text{NaOH} \ 0.01 \text{ mol L}^{-1}$ más cinco adiciones de glucosa estándar $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ sobre un electrodo de carbón vítreo con electrodepósito de plata a $E=0.60 \text{ V}$ . b) Curva de adición estándar correspondiente al registro cronoamperométrico. ....	44
Figura 32. a) Registro cronoamperométrico para una adición de $0.1 \text{ mL}$ de dilución $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ de muestra 2 en $10 \text{ mL}$ de $\text{NaOH} \ 0.01 \text{ mol L}^{-1}$ más cinco adiciones de glucosa estándar $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ sobre un electrodo de carbón vítreo con electrodepósito de plata a $E=0.60 \text{ V}$ . b) Curva de adición estándar correspondiente al registro cronoamperométrico. ....	45

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sensores de glucosa no enzimáticos basados en platino. ....	13
Tabla 2. Sensores de glucosa no enzimáticos basados en oro.....	14
Tabla 3. Sensores de glucosa no enzimáticos basados en cobre.....	15
Tabla 4. Sensores de glucosa no enzimáticos basados en plata.....	16
Tabla 5. Parámetros analíticos de las curvas de calibrado sucesivas a, b y c de glucosa para pH 12,13 y 14. ....	32
Tabla 6. Parámetros estadísticos de las curvas de calibrado sucesivas de glucosa a, b y c correspondientes a la figura 27 y 28.....	36
Tabla 7. Parámetros analíticos de las curvas de calibrado sucesivas de glucosa en la evaluación de potencial de electrodepósito.....	37
Tabla 8. Parámetros analíticos de las curvas de calibrado sucesivas de glucosa a, b y c para diferentes tiempos de electrodepósito (tiempo de preoxidación = 900 s).38	
Tabla 9. Parámetros analíticos de las curvas de calibrado sucesivas de glucosa a, b y c para diferentes tiempos de preoxidación (tiempo de electrodepósito = 60 s)..	38
Tabla 10. Parámetros analíticos de curvas de calibrado de glucosa de distintos electrodepósito.....	39
Tabla 11. Parámetros analíticos de las curvas de calibrado sucesivas de glucosa sobre un mismo electrodepósito. ....	40
Tabla 12. Parámetros analíticos de una curva de calibrado de Glucosa.....	41
Tabla 13. Estudio de coeficientes de selectividad para distintos interferentes para un electrodo de carbón vítreo con electrodepósito de plata utilizado para la detección de glucosa.....	42
Tabla 14. Comparación entre concentración reportada por el fabricante y la obtenida utilizando un electrodo de carbón vítreo con electrodepósito de plata (Muestra 1). ....	43
Tabla 15. Comparación entre concentración reportada por el fabricante y la obtenida utilizando un electrodo de carbón vítreo con electrodepósito de plata. Muestra 2. ....	45

## ABREVIATURAS

ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
cm	Centímetros
dL	Decilitro
DS	Desviación estándar
DSR	Desviación estándar relativa
FAD	Dinucleótido de flavina y adenina
G	Glucosa
G-6-PDH	Glucosa-6- fosfatodeshidrogenasa
GOx	Glucosa oxidasa
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
i	Intensidad de corriente
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
ITO	Óxido de indio y estaño
K	Coefficiente de selectividad
L	Litro
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
M	Molar
M*	Mediador sintético
$\mu$ A	Microamperes
mg	Miligramos
mM	Milimolar
mm	Milímetros
mV	Milivolts
MWCNTs	Nanotubos de carbono multipared
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NIR	Espectroscopía de infrarrojo cercano
nm	Nanómetro
NP's	Nanopartículas

Ox	Oxidado
POD	Peroxidasa
R <sup>2</sup>	Coefficiente de correlación
Red.	Reducido
RHE	Electrodo de referencia de hidrógeno
s	Segundos
SCE	Electrodo saturado de calomel
TTF-TCNQ	Tetratiafulvaleno-tetracionoquinodimetano
UV	Ultravioleta
V	Volt

## 1 INTRODUCCIÓN

La glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) es un carbohidrato cuya principal función en el metabolismo humano es proveer de energía a las células del cuerpo para realizar sus funciones vitales. Su obtención es simple ya que está presente en la mayoría de alimentos.

Las reacciones químicas que se llevan a cabo en el proceso de la digestión, transforman a los alimentos con alto contenido en hidratos de carbono en unidades de glucosa las cuales del intestino delgado pasan al torrente sanguíneo y finalmente a las células para poder ser utilizada como fuente de energía.

La concentración de la glucosa en la sangre está regulada por una hormona producida por el páncreas, la insulina, la cual es la encargada de introducirla en las células del cuerpo y el exceso es almacenado como reserva de energía en forma de grasa, mediante distintas rutas metabólicas.

Cuando el páncreas no produce suficiente insulina o esta no es reconocida por las células, se incrementan los niveles de glucosa en la sangre rebasando los límites permisibles (mayores a 100 mg/dL en ayunas y 140 mg/dL 2 horas después de ingeridos los alimentos) provocando periodos de hiperglucemia (niveles de glucosa por arriba de lo normal). Este desorden, aunado a otros factores de riesgo puede desencadenar graves problemas de salud relacionados con la diabetes [1]. La diabetes es una enfermedad crónico-degenerativa; su tratamiento incluye una dieta que satisfaga los requerimientos nutricionales de un paciente con esta enfermedad, un tratamiento farmacológico recomendado por un especialista y del monitoreo constante de glucosa en sangre.

La aplicación de técnicas electroquímicas para la detección de glucosa ha llevado al desarrollo de biosensores, los cuales brindan significativas ventajas sobre las técnicas tradicionales al poseer alta selectividad, bajo costo, posibilidad de ser miniaturizados e incorporados en sistemas automatizados de análisis y reducido tiempo de análisis [2].

En los últimos años las innovaciones en los biosensores electroquímicos se han enfocado en remplazar la parte biológica del biosensor por un catalizador metálico, el cual sea capaz de brindar la misma eficiencia y selectividad que poseen los biosensores de los cuales, la mayoría hacen uso de enzimas como elemento de reconocimiento.

Este trabajo explora el uso de óxido de plata electrodepositado sobre la superficie de un electrodo de carbón vítreo para la detección de glucosa. Los análisis realizados mediante voltamperometría cíclica permitieron obtener el perfil del electrodeposición y de la oxidación de la glucosa para su posterior optimización y la obtención de los parámetros analíticos de la técnica propuesta, además de lograr

EVALUACIÓN DE UN SENSOR NO ENZIMÁTICO CON PELÍCULA DE PLATA PARA LA  
DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

---

conocer los alcances y limitaciones mediante la evaluación de especies interferentes y la respuesta que presenta a muestras reales de distinta complejidad.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 GLUCOSA

La glucosa es un monosacárido con fórmula molecular  $C_6H_{12}O_6$ , el cual presenta dos enantiómeros, la D-glucosa y L-glucosa. En plantas y animales la forma predominante es la D-glucosa, la cual es participe en funciones relacionadas al crecimiento de células, en la síntesis de aminoácidos no esenciales y como principal fuente de energía (Fig. 1) [3,4].

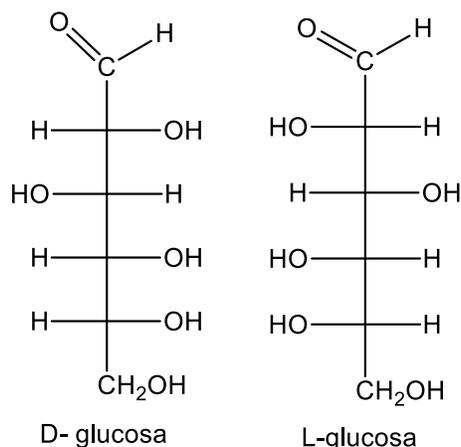


Figura 1. Enantiómeros de la glucosa.

Los monosacáridos poseen un sabor dulce, son cristalizables y solubles en agua. Cuando un azúcar con cinco o más carbonos en su estructura se encuentra en solución sufre una ciclación, dando como resultado una estructura similar al anillo de pirano (anillo de seis miembros) o furano (anillo de cinco miembros). En este proceso de ciclación el grupo carbonilo de la glucosa forma un enlace covalente con el oxígeno del grupo hidroxilo para formar un grupo hemiacetal con un carbono asimétrico el cual es el responsable de las formas estereoisoméricas de los monosacáridos, si el carbohidrato ciclado posee un grupo hemiacetalico libre se trata de un azúcar reductor el cual puede ser oxidado. Cuando la  $\alpha$ -D-glucosa se encuentra en solución presenta dos anómeros: la  $\alpha$  y  $\beta$  glucopiranososa (Fig. 2) con relación un tercio y dos tercios respectivamente. La interconversión entre anómeros es un fenómeno conocido como mutarrotación y en equilibrio la rotación óptica de esta mezcla adquiere un valor de  $+52.5^\circ$  en un tiempo promedio de 12 horas a partir de preparada la solución [5,6,7].

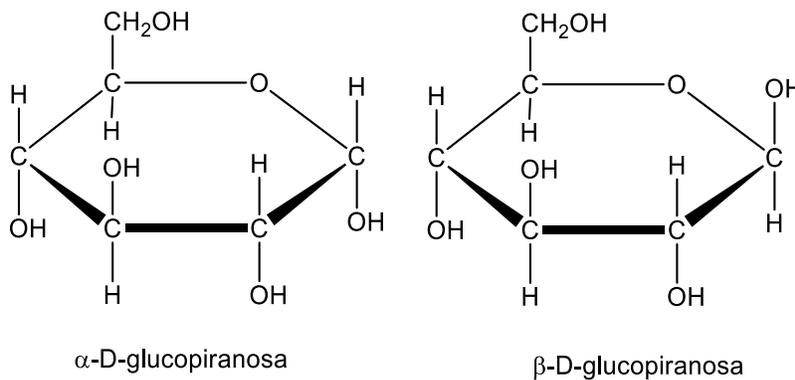


Figura 2. Anómeros de la  $\alpha$ -D-glucosa en solución.

En el organismo, existen diversas rutas metabólicas encargadas de regular distintas funciones para el correcto funcionamiento del cuerpo; una de las más importantes es la glucólisis, la cual mantiene regulados los niveles de glucosa en la sangre. Esta ruta se encarga de metabolizar la cantidad necesaria de glucosa para realizar las funciones vitales del organismo. La glucosa es transportada por el torrente sanguíneo hacia los distintos órganos donde su incorporación a las células depende de una hormona secretada por el páncreas, la insulina [7].

Cuando existe un exceso de este monosacárido en la sangre, es almacenado en forma de glucógeno por medio de la glucogénesis y en ácidos grasos por medio de la lipogénesis, esto para que puedan ser utilizados como reserva de energía en caso de ayunos prolongados o deficiencia calórica [7].

Los niveles normales de glucosa en la sangre se encuentran en un intervalo de 60 - 100 mg/dL en ayuno, y 60-140 mg/dL 2 horas después de la ingesta de alimentos; niveles de glucosa en sangre superiores a los límites máximos saludables (hiperglicemia) pueden ser causados por bajos niveles de insulina en el organismo debido a una escasa producción de insulina por parte del páncreas o por falta de reconocimiento de las células hacia esta hormona. Aunado a esto, malos hábitos de alimentación, escasa actividad física o afecciones genéticas pueden desencadenar en Diabetes *Mellitus*, la cual actualmente representa un problema grave de salud a nivel mundial y la segunda causa de muerte en México, según los datos reportados por el INEGI en 2018 [1,8].

El seguimiento de los niveles de glucosa en pacientes con Diabetes requiere de un monitoreo constante y de alta precisión; así mismo, en el ámbito alimenticio es necesaria su cuantificación para brindar información sobre el producto al consumidor. Así, se han desarrollado técnicas para la detección y cuantificación de este carbohidrato en muestras biológicas y en la industria alimenticia.

## 2.2 MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA Y DETECCIÓN DE GLUCOSA

El principal reto que enfrentan los métodos para la determinación y cuantificación de glucosa es lograr que estos sean selectivos debido a la similitud que presenta la glucosa con otras biomoléculas. Los primeros ensayos desarrollados se basaban en métodos colorimétricos poco específicos para la detección general de azúcares reductores en sangre, por ejemplo, el reactivo de Benedict mediante el cual era posible oxidar a la glucosa con  $\text{Cu}^{2+}$ , obteniendo un precipitado colorido [9] (Ec. 1).



El objetivo para el desarrollo de nuevos métodos es romper con la barrera de selectividad, disminuyendo los costos y así ampliar el área de aplicación tanto en el control clínico de glucosa como en la industria alimenticia. Una clasificación de estos métodos analíticos se muestra a continuación:

### 2.2.1 Métodos Espectrofotométricos

Las enzimas tienen la característica de poseer gran selectividad hacia su sustrato y el producto resultante puede ser cuantificado. Así se han desarrollado métodos espectrofotométricos y colorimétricos utilizando enzimas como la glucosa oxidasa y la hexoquinasa.

#### 2.2.1.1 Glucosa oxidasa (GOx)

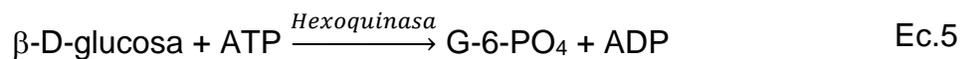
La actividad catalítica de la enzima Glucosa Oxidasa (GOx) depende de un átomo de hierro y de la presencia del dinucleótido de adenosina y flavina en su estructura, el cual es responsable de las reacciones de óxido-reducción [9,10].

La reacción consiste en la oxidación catalizada por la GOx de la  $\beta$ -D-glucosa a ácido glucónico y la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Ecs. 2 y 3). Para la detección es necesario el uso de la enzima peroxidasa (POD) y el uso de un grupo cromóforo: 4-aminoantipiridina en presencia de fenol (514 nm) ó *o*-dianisidina/ácido sulfúrico (540 nm). Así, de esta reacción se obtendrá la forma oxidada del cromóforo la cual puede ser cuantificada por medio de un espectrofotómetro (Ec. 4) [9].



### 2.2.1.2 Hexoquinasa

El método de la hexoquinasa para la cuantificación de glucosa involucra en primera instancia el uso de esta enzima para la fosforilación de la glucosa (Ec. 5) y posteriormente de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD), la cual utilizará como sustrato al producto de la reacción anterior para obtener ácido glucónico y NADPH (Ec. 6). Este último es medido mediante espectrofotometría a 340 nm, por lo cual un aumento de concentración de NADPH incrementará la absorbancia a esta longitud, la cual será proporcional a la concentración de glucosa [9].



### 2.2.2 Métodos Cromatográficos

La aplicación de métodos enzimáticos para la cuantificación de glucosa presenta la desventaja del alto costo de las enzimas utilizadas y la necesidad de operar en condiciones de temperatura y pH controladas, es por ello que surgió la necesidad de desarrollar métodos en los cuales se disminuyera o eliminara el uso de enzimas.

La detección de carbohidratos es posible mediante la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Para la glucosa y otros monosacáridos se ha hecho uso de la cromatografía iónica, de fase inversa, de exclusión de tamaños y de interacción hidrofílica [9].

Dentro de los detectores más comúnmente utilizados en HPLC para la detección de monosacáridos se encuentran los de índice de refracción, UV, fluorescencia y amperométricos, aunque la selección dependerá del tipo y condiciones de la cromatografía a utilizar [9].

#### 2.2.2.1 Cromatografía Iónica

En la cromatografía iónica el analito se retiene sobre la fase estacionaria, generalmente estructurada a base de aminas cuaternarias, y la fase móvil está compuesta por una solución alcalina. El aumento de pH mediante un gradiente de concentración dará como resultado a los carbohidratos en su forma aniónica aumentando la interacción con la fase móvil y eluyéndolos de la columna. Al disminuir el pH, el analito retomará su forma neutra finalizando la interacción.

Aunque la cromatografía iónica brinda buenos resultados, las condiciones básicas pueden causar la descomposición de los azúcares y los tiempos de análisis son

largos, lo que coloca a esta alternativa analítica en desventaja frente a otras técnicas [9, 11,12].

### **2.2.2.2 Cromatografía de Fase Inversa**

En la cromatografía de fase inversa los monosacáridos son sometidos a una derivatización con grupos aromáticos para convertirlos en moléculas hidrófobas y así aumentar su afinidad con la fase estacionaria para lograr que eluyan al aplicar un gradiente de polaridad en la fase móvil.

La polaridad de la fase móvil está regulada mediante el aumento o disminución de la concentración del solvente orgánico, mientras que las columnas más utilizadas para la separación de monosacáridos son generalmente las columnas C8 y C18 [9,11].

### **2.2.2.3 Cromatografía de Exclusión de Tamaños**

Este tipo de cromatografía se utiliza generalmente para separar azúcares poliméricos; sin embargo, se ha evaluado para la separación de glucosa en donde la fase móvil es acuosa y la fase estacionaria es una columna polimérica. Uno de los principales problemas que enfrenta esta técnica, es la escasa diferencia entre el peso molecular de la glucosa y la fructosa por lo cual no es posible llevar la separación entre estos dos monosacáridos cuando ambos se encuentran presentes en una matriz [11].

### **2.2.2.4 Cromatografía de Interacción Hidrofílica**

La cromatografía de interacción hidrofílica ha sido aplicada en el análisis de carbohidratos debido a que brinda eficientes resultados en la separación de compuestos con alta polaridad. En este tipo de cromatografía la fase estacionaria consiste en una columna de sílice generalmente funcionalizada con grupos amino, donde los analitos se retienen mediante puentes de hidrógeno; la fase móvil es una mezcla agua-solvente orgánico, generalmente acetonitrilo. El orden de elución dependerá del carácter hidrofílico y de la polaridad de los analitos [11, 13].

## **2.2.3 Métodos Electroquímicos**

Las técnicas electroquímicas permiten caracterizar mediante una celda electroquímica una muestra problema. Aunque no es posible medir directamente la concentración de glucosa, es posible establecer una relación actividad-concentración. Estas técnicas se caracterizan por poseer una alta selectividad, además de emplear dispositivos de bajo costo [14].

### 2.2.3.1.1 Biosensores Amperométricos de Glucosa

Dentro de las técnicas electroquímicas empleadas se encuentra el uso de sensores. Un sensor químico es un dispositivo analítico que al llevar a cabo una interacción química con el analito transforma la información química en una señal de tipo cualitativa o cuantitativa [15]. Generalmente se componen de un receptor que realiza el reconocimiento del analito y un transductor el cual es responsable de transformar la información del reconocimiento en una señal medible (Fig. 3) [4,15, 16].

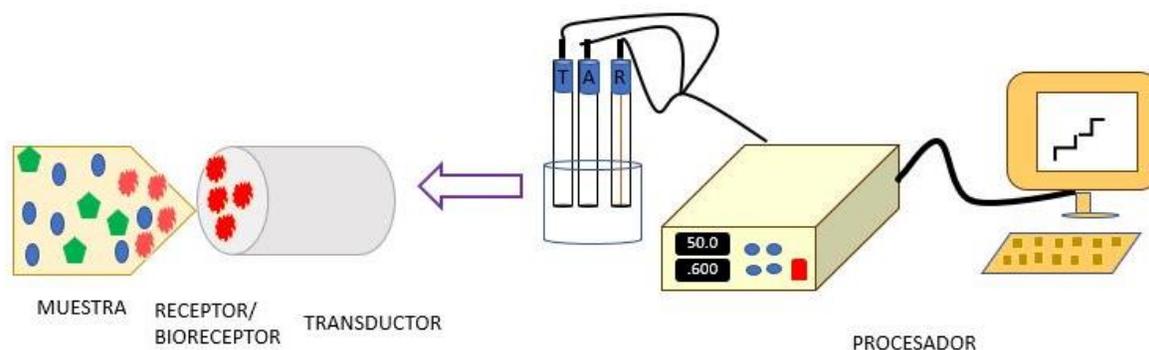


Figura 3. Esquema general de un sensor electroquímico.

De acuerdo al tipo de señal que mide el transductor, los sensores químicos se pueden clasificar en ópticos, piezoeléctricos (másicos), térmicos y electroquímicos; estos últimos pueden clasificarse a su vez en amperométricos y potenciométricos. Los sensores electroquímicos potenciométricos miden el potencial interfacial en la superficie del electrodo debido a una reacción selectiva de intercambio iónico; por ejemplo, el electrodo de pH. Los sensores potenciométricos operan en condiciones de corriente nula, representativa de un proceso electroquímico en equilibrio. Por otra parte, los sensores amperométricos producen una señal de corriente relacionada con la concentración del analito debido a un proceso de oxidación o reducción.

Los sensores amperométricos tienen la ventaja de poseer alta sensibilidad y un precio relativamente bajo. Con ellos es posible analizar cualquier tipo de muestra, sólida, líquida o gaseosa, además de que pueden trabajar en altas temperaturas utilizando el electrolito adecuado. El primer reporte de un sensor amperométrico fue el desarrollado por Clark para medir el oxígeno en la sangre hace aproximadamente 70 años [15,17].

Los biosensores hacen uso de un transductor responsable de la sensibilidad y de especies de reconocimiento biológico o bioreceptores como enzimas, tejidos o células, lo que les otorga una alta selectividad a ciertas moléculas en específico, normalmente de interés biológico [3,4]. Este tipo de sensores son una alternativa atractiva de análisis debido a su alta sensibilidad, corto tiempo de análisis, compatibilidad con la automatización, uso de pequeños volúmenes de muestra y permiten el monitoreo “in vivo”; sin embargo, debido al uso de especies biológicas las condiciones de análisis deben de estar estrictamente controladas.

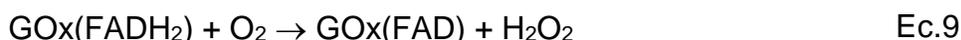
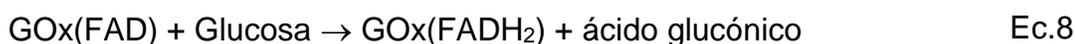
A través de los años los biosensores han evolucionado para tratar de contrarrestar las limitaciones a las que se enfrentan; así, el desarrollo de los biosensores electroquímicos se puede entender mediante su clasificación por generaciones (Fig. 4):

### 2.2.3.1.2 Biosensores de Primera Generación

Los sensores de primera generación se basan en el uso de enzimas para la oxidación de glucosa; el mecanismo consiste en la oxidación de glucosa catalizada por la enzima en presencia de oxígeno para formar ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, este último puede ser detectado y cuantificado amperométricamente (Ec. 7). [16-19]



La reacción catalítica entre la enzima y la glucosa se describe por las ecuaciones 8 y 9.



Existen diferentes enzimas que pueden oxidar a la glucosa, entre ellas está la glucosa deshidrogenasa (GDH), glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa (G-6-PDH) y la glucosa oxidasa (GOx); esta última resulta ser la más económica y utilizada [19].

Este sistema de cuantificación de glucosa ha resultado ser muy útil debido a que el dispositivo puede ser miniaturizado; sin embargo, a pesar de ello la principal desventaja que presenta este esquema es el potencial alto en el cual se detecta el peróxido, +1.1 V (vs Ag/AgCl) al que pueden ocurrir simultáneamente reacciones de oxidación de otras sustancias interferentes como es el caso del ácido úrico y ácido ascórbico. La baja solubilidad de oxígeno en fluidos biológicos es una

desventaja adicional, ya que es imprescindible para regenerar el sitio activo de la enzima y producir el peróxido de hidrógeno [16,17,19].

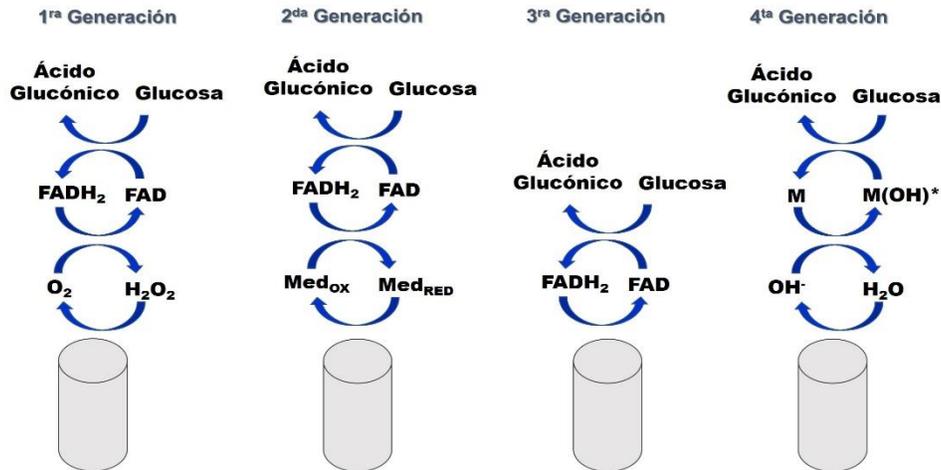
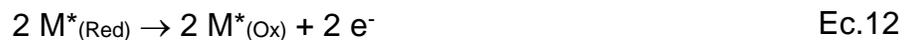
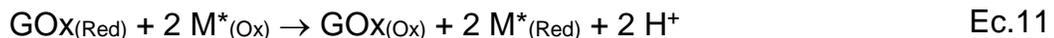
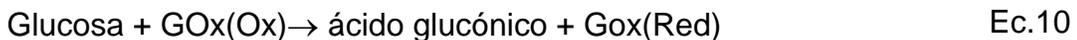


Figura 4. Resumen de mecanismos de la oxidación de glucosa en las diferentes generaciones de biosensores.

### 2.2.3.1.3 Biosensores de Segunda Generación

La capa de proteína que rodea al centro activo de la GOx representa un impedimento más para la transferencia directa de electrones en el electrodo, por lo que es necesario implementar el uso de mediadores sintéticos que replacen al oxígeno como el aceptor de electrones y así facilitar el contacto entre el centro activo de la enzima y el electrodo [19, 20].

La serie de pasos involucrados en los dispositivos de segunda generación son la transferencia de electrones de la glucosa al centro reactivo de la GOx (FAD), para obtener FADH<sub>2</sub>, seguida de la transferencia de electrones del FADH<sub>2</sub> al mediador sintético (M\*) para que finalmente sea este el responsable del transporte de los electrones al electrodo (Ecs. 10-12) [20].



Así, la especie reducida del mediador se reoxida en la superficie del electrodo y la señal resultante será proporcional a la concentración de glucosa presente.

Los mediadores deben de cumplir con las condiciones de reaccionar rápidamente con la enzima, poseer un bajo potencial redox y que este sea independiente del pH; además de una baja solubilidad en medio acuoso. Derivados de ferroceno, ferrocianuro, complejos de metales de transición y compuestos orgánicos como el tetratíafulvaleno-tetracianoquinodimetano (TTF-TCNQ) han sido utilizados como especies mediadoras, siendo el ferroceno uno de los más aplicados debido que presentan un bajo potencial redox que logra minimizar la respuesta de especies interferentes. Para aumentar la eficiencia del mediador, se ha recurrido al uso de polímeros como polisiloxano o polianilina para la inmovilización del mediador en la superficie del electrodo [16,17].

#### **2.2.3.1.4 Biosensores de Tercera Generación**

Los biosensores de tercera generación buscan la transferencia directa entre la proteína inmovilizada y la superficie del electrodo [17]. Heller *et. al* presentan uno de los primeros trabajos acerca de una innovación conocida como “cableado de la enzima” en donde mediante modificación química se logró enlazar a la enzima a un electrodo de oro, platino o carbón para formar enlaces covalentes con la proteína de la GOx, haciendo más corta la vía de transferencia de electrones con la superficie del electrodo [19, 21].

En otros reportes se ha demostrado que algunas enzimas como la peroxidasa pueden transferir los electrones del centro activo, directamente al electrodo. Esta estrategia, solo es posible cuando la capa proteica que rodea al centro activo es muy delgada [22].

#### **2.2.4 Otros Métodos**

Existen técnicas sencillas que permiten la determinación de glucosa; por ejemplo, la refractometría y la densidad donde mediante curvas de calibrado con patrones estándar, es posible la cuantificación de glucosa.

La espectroscopia del infrarrojo cercano (NIR) permite la cuantificación de glucosa mediante la intensidad de picos de vibración; sin embargo, especies interferentes similares en estructura y la presencia de agua, hacen difícil el análisis de los resultados por lo que ha sido necesario recurrir a un tratamiento matemático como el análisis multivariable y la quimiometría mediante el cual es posible realizar una predicción de la cantidad de azúcar presente en una muestra [23, 24].

### 2.2.4.1 Electroodos no Enzimáticos de Óxidos Metálicos

Los electroodos de óxidos metálicos son un tipo de sensores electroquímicos que algunos autores los refieren como “biosensores de cuarta generación” o “electroodos no enzimáticos”. Hacen uso de partículas activas de óxidos de metales como Au y Pt en sistemas electroquímicos para la detección de azúcares. [20, 21].

Las desventajas que presentan este tipo de novedosos sistemas son la cinética lenta de la electrooxidación de glucosa sobre electroodos convencionales y la baja selectividad de los sensores no enzimáticos hacia la glucosa debido al alto rango de potencial donde se observa la oxidación de glucosa. Asimismo, la adsorción de aniones como el cloruro sobre los electroodos de metal representan una desventaja que se ha logrado minimizar al trabajar en condiciones alcalinas [20].

El mecanismo de oxidación de la glucosa por la vía no enzimática consiste en la abstracción del protón hemiacetalico que ocurre simultáneamente con la absorción de las especies orgánicas. Burke propone un modelo en donde el ion hidroxilo forma una pre-monocapa de hidróxido de metal “activo” (MOH\*) en donde la cercanía de los iones produce la disociación del agua para la electrooxidación de la glucosa [20, 25].



Los metales nobles sufren oxidación mediante procesos químicos de superficie dando paso a la formación de múltiples capas de óxidos, el intercambio entre las especies de OH/O con átomos del metal es un proceso determinante para la formación de un depósito multicapas de óxido [26].

Debido a la respuesta electrocatalítica eficiente y rápida que presentan las interfaces formadas en electroodos de óxidos de metales (Pt, Au, Cu, Ag) se han realizado diversos estudios en los cuales estos materiales son evaluados como posibles sensores no enzimáticos para la detección de glucosa.

### 2.2.4.2 Sensores no enzimáticos de Platino

El desarrollo de electroodos modificados de platino permitió la oxidación de la glucosa en medios ácidos, neutros y alcalinos, observando tres picos de oxidación en potenciales aproximados a -0.4 V, 0.3 V y 0.5 V (vs RHE) (Tab. 1) [27].

Este tipo de material puede ser sometido a altas temperaturas para su esterilización para su uso en el área de la salud; sin embargo, su elevado costo reduce la posibilidad de aplicarlo en otras áreas [27].

Tabla 1. Sensores de glucosa no enzimáticos basados en platino.

Electrodo	Estructura	Sensibilidad ( $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ )	Potencial de trabajo	Referencia (Año)
<b>Pt-óxido de grafeno</b>	nanoflores	1.3	0.47 V (vs SCE)	28 (2013)
<b>Pt-Te</b>	microtubos	522.6	-0.40 V (vs SCE)	29 (2012)
<b>Pt-quitosano</b>	nanopartículas	no reportada	0.35 V (vs SCE)	30 (2010)
<b>Pt</b>	nanoporos	291.0	0.40 V (vs Ag/AgCl)	31 (2008)
<b>Pt</b>	mesoporos	9.6	0.42 V (vs Ag/AgCl)	32 (2003)

### 2.2.4.3 Sensores no enzimáticos de Oro

A diferencia de los sensores desarrollados a base de platino, los sensores de oro dependen del pH así como de la composición del electrolito y de la estructura del electrodo, estas condiciones se deben a que en los átomos de oro el orbital "d" se encuentra completo, sin embargo, poseen una mayor electroactividad hacia la oxidación de glucosa. Es por ello que se desarrollaron diferentes electrodos a base de este metal, destacando los electrodos porosos debido a que presentan estructuras regulares (Tab.2) [27].

Tabla 2. Sensores de glucosa no enzimáticos basados en oro.

Electrodo	Estructura	Sensibilidad ( $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ )	Potencial de trabajo	Referencia (Año)
<b>Au-nanorribones óxido de grafeno</b>	nanopartículas	31.4	0.257 V (vs Ag/AgCl)	33 (2014)
<b>Au</b>	nanocables	309.0	-0.40 V (vs Hg/HgO)	34 (2012)
<b>Au- carbón vítreo</b>	nanoestructuras	190.7	0.150 V (vs Ag/AgCl)	35 (2014)
<b>Au</b>	nanocajas	2,131.0	0.230 V (vs Ag/AgCl)	36 (2016)
<b>Au</b>	poros	11.8	0.31 V (vs	37 (2007)

#### 2.2.4.4 Sensores no enzimáticos de Cobre

El uso de cobre para el desarrollo de sensores no enzimáticos surge de la necesidad de utilizar materias primas económicas y de la eficiencia catalítica que posee este material, Fleischmann y su equipo de trabajo atribuyen el poder oxidativo del cobre a la formación de una especie de Cu (III) observada en un potencial de 0.65 V (vs.SCE); sin embargo, el mayor problema que presenta es la oxidación de interferencias (Tab. 3).

Tabla 3. Sensores de glucosa no enzimáticos basados en cobre.

Electrodo	Estructura	Sensibilidad ( $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ )	Potencial de trabajo	Referencia (Año)
<b>Carbón Vítreo Cu</b>	nanocables	420.3	0.59-0.72 V (vs Ag/AgCl)	38 (2011)
<b>Pasta de carbono/silicón Cu</b>	poros	no reportada	0.55 V (vs Ag/AgCl)	39 (2014)
<b>Cu/ITO</b>	película	699.4	0.4 V (vs Ag/AgCl)	40 (2010)
<b>Carbono multipared (MWCTNs)</b>	nanocubos	1,096.0	0.55 V (vs Ag/AgCl)	41 (2010)
<b>Carbón Vítreo/Cu</b>	microflores	no reportada	0.50 V (vs Ag/AgCl)	42 (2018)

#### 2.2.4.5 Sensores no enzimáticos de Plata

Los estudios acerca de los electrodepositos de plata han revelado que este proceso se lleva a cabo mediante una nucleación tridimensional múltiple seguida de la difusión controlada del crecimiento de los núcleos, donde las características finales de la superficie obtenida dependerán de la primera etapa del proceso [43].

Los electrodepositos de plata requieren de un potencial aplicado. En ocasiones utilizan una solución de cianuro para generar un electrodeposito liso y sin crecimientos dendríticos [44], pero debido al impacto ambiental que generan los residuos se ha optado por utilizar como materia prima la sal de  $\text{AgNO}_3$ , aunque la calidad de electrodeposito disminuye debido a que presenta rugosidad, según reporta Taft y colaboradores [45].

La oxidación de estos electrodepositos se da en medios alcalinos en potenciales cercanos a +0.60 V (vs SCE) [44, 46], obteniendo una superficie de  $\text{Ag}_2\text{O}/\text{AgO}$ . Estas especies pueden ser identificadas mediante una voltamperometría cíclica en forma de dos picos en aproximadamente 0.30 y 0.65 V (vs SCE) en sentido anódico, confirmándose la presencia de estas especies con dos picos en sentido catódico correspondientes a la reducción de  $\text{AgO}$  y  $\text{Ag}^0$  respectivamente, siendo

los cúmulos obtenidos en esta capa generalmente formados por partículas de tamaño nanométrico [44, 45, 47, 48].

Las nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos presentan respuesta electroquímica relevante y poseen una alta relación superficie-volumen y un elevado transporte de masa; es por ello que se ha implementado su aplicación en la electrocatálisis en particular. Las NP's de Ag presentan características muy útiles e interesantes como una excelente conductividad térmica y eléctrica, resistencia química, catalítica y actividad bactericida [44,46].

Las propiedades electroquímicas particulares de las nanopartículas de plata dependen de su tamaño, la cantidad electrodepositada sobre la superficie del electrodo y de parámetros como el potencial, la densidad de corriente, el tiempo de deposición, etc. (Tab. 4) [44,49].

Tabla 4. Sensores de glucosa no enzimáticos basados en plata.

Electrodo	Estructura	Sensibilidad ( $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ )	Potencial de trabajo	Referencia (Año)
Ag	óxidos de Ag	no reportada	0.45 V (vs SCE)	50 (1992)
Ag	NPs de Ag y carbón negro en matriz de poliestireno	no reportada	0.75 V (vs Hg/HgO)	51 (2009)
Pasta de carbono	SiO <sub>2</sub> funcionalizado con NPs de Ag decoradas con carboxilo	0.3	-0.35 V (vs. Ag/AgCl)	52 (2016)
Carbón vítreo	nanofibras de Ag/CuO	1,347.0	0.50 V (vs SCE)	53 (2012)
Carbón vítreo	óxido de grafeno con NP's de Ag	11.0	+0.60 V (vs Hg/HgO)	47 (2015)
Carbón Vítreo	nanotubos de carbón multipared con NP's de Ag	1,057.3	0.58 V (vs. Ag/AgCl)	54 (2016)

### 3 JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia que representa la regulación de la concentración de glucosa en el sector industrial y salud, se han desarrollado métodos enfocados a la detección y cuantificación de este carbohidrato en matrices de distinta complejidad, entre los cuales se encuentran los métodos cromatográficos, espectrofotométricos y electroquímicos, siendo estos últimos los que han mostrado mayor simplicidad y versatilidad.

Dentro de los métodos electroquímicos destaca la aplicación de los biosensores amperométricos debido a que resultan ser dispositivos de bajo costo y fácil operación; sin embargo, el uso de enzimas como bioreceptores limita su aplicación debido al alto costo y a las condiciones específicas de operación, como el pH y la temperatura, es por ello que ha surgido la necesidad de reemplazar la parte biológica por nuevos materiales que resulten ser más económicos y flexibles a las condiciones de análisis.

Estudios recientes se han enfocado en la aplicación de óxidos de metales de transición como el reemplazo de las enzimas en los biosensores, dando paso a una nueva generación de sensores conocidos como “biosensores de cuarta generación” o “biosensores no enzimáticos”, con la finalidad de disminuir los costos de los dispositivos y ampliar las condiciones en las cuales puedan operar.

El uso de electrodepositos de óxidos de metales de transición ha resultado ser una opción viable debido a que son superficies renovables y su respuesta a la presencia de glucosa ha resultado positiva, es por ello que en este trabajo se evalúa una película de óxido de plata electrodepositada sobre la superficie de un electrodo de carbón vítreo como sensor no enzimático y se estudia su respuesta en la cuantificación de glucosa analizando posibles interferencias.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el uso de una película de óxido de plata como un sensor amperométrico no enzimático para la detección y cuantificación de glucosa en muestras reales.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

Construcción y caracterización por voltamperometría cíclica de un transductor basado en un electrodeposición de plata sobre una superficie de carbón vítreo.

Caracterización de la respuesta electroquímica del electrodeposición oxidado a la presencia de glucosa mediante voltamperometría cíclica.

Optimización de las condiciones involucradas en el proceso de la oxidación de glucosa.

Obtención de los parámetros analíticos del sensor propuesto y evaluación de la respuesta que presenta a muestras de distinta composición.

## 5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 5.1 REACTIVOS Y SOLUCIONES

Todos los reactivos utilizados para realizar cada uno de los experimentos son de grado analítico NaOH (Aldrich),  $\text{AgNO}_3$  (Fluka),  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Productos químicos Monterrey), Glucosa (Técnica Química), Fructosa, Lactosa (Meyer), Ácido ascórbico (Aldrich) y Óxido de alúmina (Alfa Aesar). Las soluciones fueron preparadas con agua desionizada Milli Q (Millipore) (18.2 M $\Omega$  cm).

### 5.2 INSTRUMENTACIÓN

Los estudios amperométricos se realizaron utilizando un equipo AUTOLAB PGSTAT302N (Metrohm) con un software NOVA 2.0. Como electrodo de trabajo (T) se utilizó un electrodo carbón vítreo (CV) MF 2012 (BASi) de 3 mm de diámetro ó un electrodo de plata (Ag) MF-2111 (BASi) de 3 mm de diámetro, como electrodo auxiliar (A) un electrodo de platino (Pt) MF-2013 (BASi) de 1.6 mm de diámetro y como electrodo de referencia (R) un electrodo de doble camisa de Ag/AgCl con solución externa de  $\text{KNO}_3$  10% (900200 Orion). Los estudios cronoamperométricos se realizaron con un Amperímetro LC-4C (BASi).

### 5.3 ELECTRODEPÓSITO DE PLATA

Los estudios voltamperométricos se realizaron en una celda conformada por un electrodo de carbón vítreo como electrodo de trabajo (T), un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia (R) y un electrodo de platino como electrodo auxiliar (A) (Fig.5).

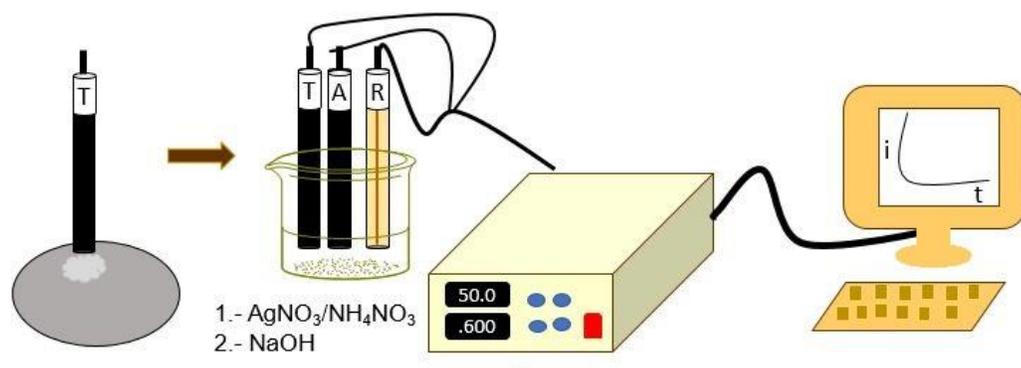


Figura 5. Esquema de electrodeposición de plata y de oxidación del electrodeposición.

Los electrodepositos de plata se realizaron a partir de 10 mL de una solución de  $\text{AgNO}_3$ , dentro de un intervalo de concentración de  $0.0005$  a  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ , en un medio de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$   $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ , sobre un electrodo de carbón vítreo previamente pulido con una suspensión de alúmina al 1% p/v.

Para la oxidación del electrodeposito, el electrodo se colocó en 10 mL de NaOH en un intervalo de concentración de  $0.001$  a  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , imponiendo un potencial de  $0.60 \text{ V}$  por un tiempo de 900 segundos.

#### **5.4 CARACTERIZACIÓN VOLTAMPEROMÉTRICA**

La caracterización del electrodeposito de plata se realizó por medio de voltamperometría cíclica partiendo del potencial de corriente nula (OCP). El intervalo de potencial fue de  $-0.60$  a  $0.90 \text{ V}$  en sentido catódico y de  $0.35$  a  $0.70 \text{ V}$  en sentido anódico a una velocidad de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

La evaluación voltamperométrica de la respuesta del electrodeposito de óxido de plata a la glucosa se llevó a cabo mediante un barrido en sentido anódico en un rango de potencial de  $-0.6$  a  $0.9 \text{ V}$ , en NaOH  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ .

#### **5.5 ESTUDIOS CRONOAMPEROMÉTRICOS**

Se realizaron estudios de variación de concentración de  $\text{AgNO}_3$  ( $0.0005$  a  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  a  $0.60 \text{ V}$ ), optimización de pH de trabajo (pH= 11-14 a  $0.60 \text{ V}$ ), evaluación de potencial de electrodeposito ( $0.20 - 0.40 \text{ V}$ ), evaluación del tiempo de electrodeposición y oxidación (30 – 90 y 600 - 1200 segundos, respectivamente, a  $0.60 \text{ V}$ ).

El estudio de la reproducibilidad entre los diferentes electrodepositos, se realizó evaluando las distintas películas de plata, manteniendo fijas las condiciones previamente establecidas (tiempo de pulido, concentración de  $\text{AgNO}_3$ , pH). La reproducibilidad entre curvas de calibrado se obtuvo utilizando un solo electrodeposito repitiendo las mediciones ocho veces.

Todos los estudios anteriores se realizaron mediante cronoamperometría.

#### **5.6 EVALUACIÓN DE INTERFERENCIAS**

Para la evaluación de interferentes se prepararon soluciones de fructosa, lactosa y ácido ascórbico de concentración  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ .

El análisis se realizó con una concentración de interferente en relación igual, diez veces mayor y diez veces menor respecto a la concentración de glucosa ( $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ ) en un medio de NaOH  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ .

### **5.7 DETERMINACIÓN DE GLUCOSA EN MUESTRAS REALES.**

La cuantificación de glucosa se realizó mediante el método de adiciones estándar por cronoamperometría. Se prepararon 10 mL de una dilución de concentración  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  de la muestra a analizar en agua desionizada, posteriormente se adicionó 0.1 mL de la dilución anterior a 10 mL de NaOH  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  seguido de cinco adiciones sucesivas de 0.1 mL de una solución estándar de glucosa  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ . Las determinaciones se realizaron por triplicado.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 6.1 CARACTERIZACIÓN VOLTAMPEROMÉTRICA

#### 6.1.1 Caracterización del electrodepósito de plata sobre el electrodo de carbón vítreo y de su respuesta a glucosa mediante voltamperometría cíclica.

El electrodepósito de la película de plata sobre el electrodo de carbón vítreo se realizó en un intervalo de -0.60 y 0.90 V, partiendo del potencial de corriente nula en sentido catódico. Se realizaron 10 ciclos en una solución de  $\text{NH}_4\text{NO}_3/\text{AgNO}_3$  de concentración  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  y  $0.005 \text{ mol L}^{-1}$  respectivamente (Fig. 6).

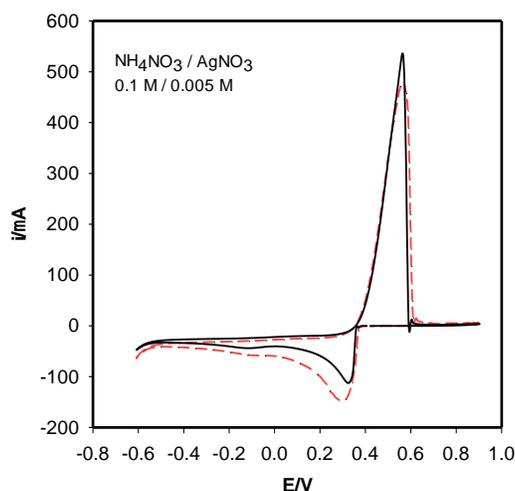


Figura 6. Electrodepósito de Ag sobre un electrodo de carbón vítreo, primer ciclo (línea negra) y décimo ciclo (línea roja punteada) a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Al iniciar el barrido de potencial partiendo de corriente nula ( $0.416 \text{ V}$ ), en sentido catódico se observa una señal de reducción ( $0.33 \text{ V}$ ) formándose el electrodepósito sobre la superficie del electrodo. Al invertir el sentido del barrido en sentido anódico se distingue la señal de oxidación de la plata depositada en  $0.53 \text{ V}$ .

Una vez generado el electrodepósito de plata sobre el electrodo de carbón vítreo, se realizó el estudio del comportamiento del sistema electroquímico con y sin presencia de glucosa en  $\text{NaOH } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ . En la Figura 7 se observan los voltamperogramas cíclicos en un rango de trabajo de  $-0.6$  a  $0.9 \text{ V}$  en sentido anódico a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , partiendo de corriente nula ( $0.168 \text{ V}$  sin glucosa).

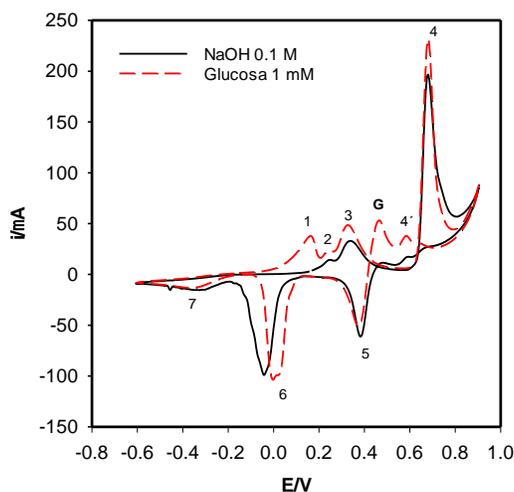


Figura 7. Voltamperogramas cíclicos del electrodo de carbón vítreo con electrodeposición de plata en NaOH 0.1 mol L<sup>-1</sup> (línea negra); NaOH 0.1 mol L<sup>-1</sup> con glucosa 1 mmol L<sup>-1</sup> (línea punteada roja). Segundo ciclo.

En el voltamperograma cíclico obtenido en NaOH 0.1 M, el pico 1 corresponde a la formación de una monocapa de AgOH, la cual se deshidrata formando una monocapa y posteriormente multicapa de Ag<sub>2</sub>O (picos 2 y 3 respectivamente). El pico 4 se asocia a la oxidación del Ag<sub>2</sub>O a AgO, proceso que se observa nuevamente al cambiar el sentido del barrido cercano a 0.60 V (pico 4'). Finalmente, los picos 5 y 6 son complementarios a los picos 3, 2 y 1 respectivamente, según reporta Joshi *et al.* [47]. La reducción numerada como 7 corresponde al oxígeno de la solución. Es importante señalar que el pico 1 se intensifica en presencia de glucosa, debido al menor potencial de corriente nula que se presenta, respecto a la solución de NaOH.

Al agregar glucosa al sistema, el AgO oxida a la glucosa sobre la superficie del electrodo, generando un aumento de Ag<sub>2</sub>O que posteriormente es reoxidado a AgO al invertir el barrido de potencial, lo que tiene como consecuencia un significativo incremento de la señal 4' correspondiente al pico "G" en 0.46 V. (Fig. 7, Ec. 15)



Una vez ubicada la respuesta del electrodo de trabajo con el electrodeposición de plata a la glucosa, se realizaron adiciones sucesivas del analito para evaluar la respuesta del sensor al aumento de concentración del carbohidrato. En la Figura 8 se observa que sólo en la primera adición se provoca un incremento en la intensidad de señal respecto a la lectura anterior. Este comportamiento sugiere la

pérdida del electrodepósito de plata durante el transcurso del estudio, ya que el incremento en la intensidad de pico de las dos primeras adiciones no es proporcional al aumento de la concentración y al seguir incrementando la concentración de glucosa se encuentra una disminución de la señal (Fig. 8).

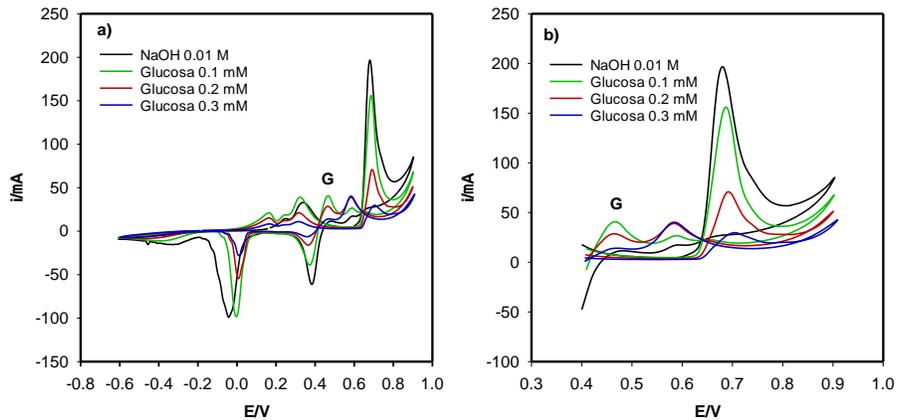


Figura 8. Voltamperogramas cíclicos de adiciones sucesivas de glucosa a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  de un electrodo de carbón vítreo con electrodepósito de plata (segundo ciclo), b) Ampliación de la zona de oxidación de glucosa.

### 6.1.2 Evaluación de la variación de la intensidad de señal respecto al tiempo.

Al evaluar el comportamiento de la señal “G” que mostró un aumento significativo en el experimento anterior, se dio seguimiento de esta señal respecto al tiempo (Fig. 9).

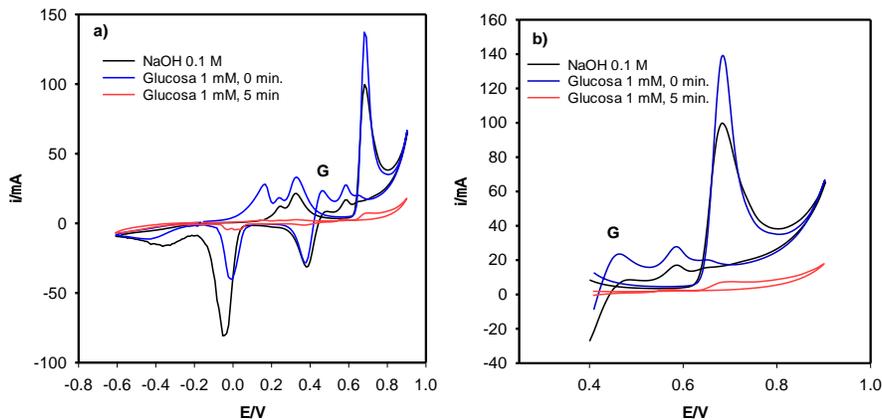


Figura 9. a) Voltamperograma cíclico de lecturas de glucosa respecto al tiempo a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  de un electrodo de carbón vítreo con electrodepósito de plata, b) Zona de oxidación de la glucosa.

Al igual que en el estudio mostrado en la Figura 8, se observó un decremento en la intensidad de la señal de la oxidación de glucosa, estos procesos pueden ser consecuencia del amplio rango de potencial de trabajo, dando tiempo a que las especies de plata presentes en el sistema se solubilizan y la cantidad de óxido disminuya en la superficie del electrodo y como consecuencia la disminución de la respuesta del electrodo a la glucosa.

### 6.1.3 Reducción del rango de potencial de trabajo para la detección de glucosa.

Para evitar la pérdida de plata de la superficie del electrodo y favorecer la formación del  $\text{Ag}_2\text{O}$ , se evaluó la oxidación de la glucosa sobre un electrodo de trabajo de plata en dos rangos de trabajo; de 0.90 a -0.60 V partiendo del potencial de corriente nula (Fig. 10) y de 0.45 a 0.70 V (Fig. 11). La condición de reducción de rango de potencial, también fue evaluada en el depósito de plata sobre el electrodo de carbón vítreo de 0.45 a 0.90 V (Fig. 12).

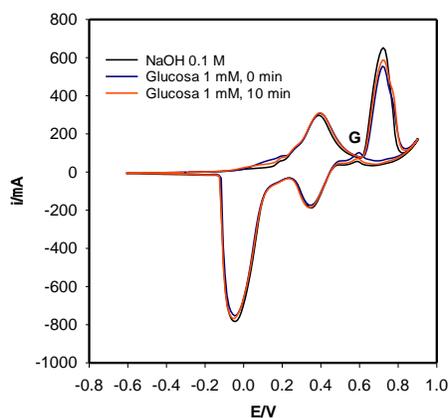


Figura 10. Voltamperogramas cíclicos de un electrodo de plata de 0.90 a -0.60 V, con lecturas de glucosa respecto al tiempo a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  en  $\text{NaOH } 0.1 \text{ mmol L}^{-1}$ .

## EVALUACIÓN DE UN SENSOR NO ENZIMÁTICO CON PELÍCULA DE PLATA PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

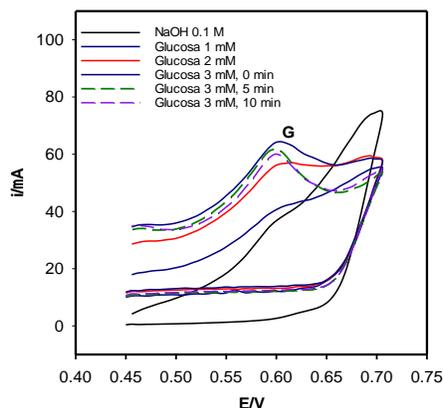


Figura 11. Voltamperograma cíclico de un electrodo de plata de 0.45 a 0.70 V, con incremento de concentración de glucosa y comportamiento respecto al tiempo ( $50 \text{ mV s}^{-1}$  en  $\text{NaOH } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

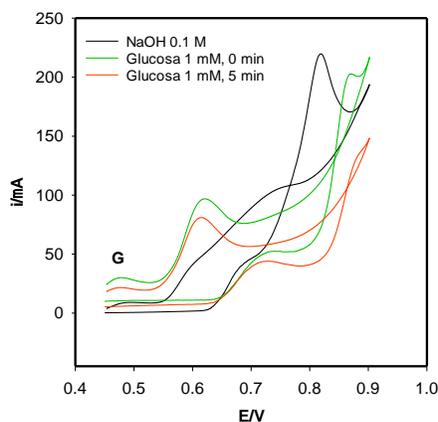


Figura 12. Voltamperograma cíclico de un electrodepósito de plata sobre un electrodo de carbón vítreo en un rango de potencial de 0.45 a 0.90 V, con incremento de concentración de glucosa y comportamiento respecto al tiempo ( $50 \text{ mV s}^{-1}$  en  $\text{NaOH } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

En los tres voltamperogramas obtenidos se observa un aumento en el pico “G” equivalente a la oxidación de la glucosa; sin embargo, a pesar de la presencia en exceso de plata en el caso de las figuras 10 y 11, esta señal disminuye en intensidad con el paso del tiempo, situación que se repite en el electrodepósito sobre el electrodo de carbón vítreo (Fig. 12). Este suceso es indicativo de la inestabilidad de los óxidos de plata ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ,  $\text{AgO}$ ) en el medio de hidróxido, más que de la pérdida de plata del electrodo.

#### 6.1.4 Evaluación de la velocidad del barrido de potencial durante el electrodeposición de plata sobre el electrodo de carbón vítreo

Independientemente de la inestabilidad de los óxidos de plata en el electrodo de carbón vítreo con electrodeposición de plata, al realizar el experimento de reducción de rango de potencial (§ 6.1.3), se observó el desprendimiento de sólido de la superficie del electrodo (Fig.13), el cual se atribuye al crecimiento desordenado del electrodeposición de plata. Para evitar esta situación se disminuyó la velocidad del barrido de potencial, evaluando  $20 \text{ mVs}^{-1}$ ,  $10 \text{ mVs}^{-1}$  y  $5 \text{ mVs}^{-1}$ ; así como el número de ciclos.



Figura 13. Observación de crecimiento 3D de óxido de plata sobre la superficie del electrodo de trabajo y desprendimiento de sólido del electrodo.

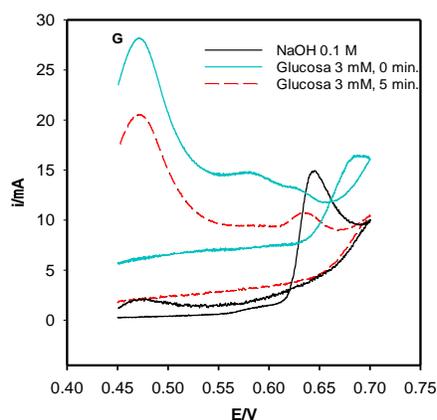


Figura 14. Voltamperograma cíclico de un electrodeposición de plata sobre un electrodo de carbón vítreo con incremento de concentración de glucosa y comportamiento respecto al tiempo ( $5 \text{ mV s}^{-1}$  en  $\text{NaOH } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

## EVALUACIÓN DE UN SENSOR NO ENZIMÁTICO CON PELÍCULA DE PLATA PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

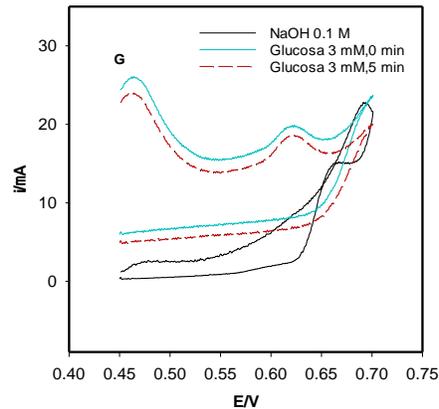


Figura 15. Voltamperograma cíclico de un electrodepósito de plata sobre un electrodo de carbón vítreo con incremento de concentración de glucosa y comportamiento respecto al tiempo ( $10 \text{ mV s}^{-1}$  en  $\text{NaOH } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

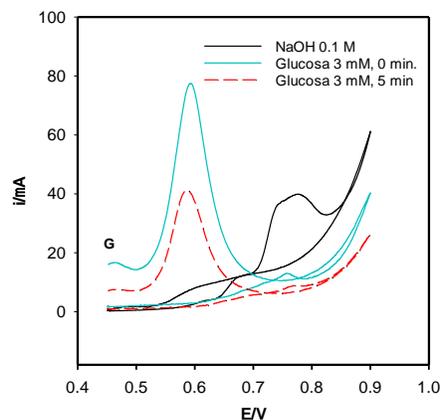


Figura 16. Voltamperograma cíclico de un electrodepósito de plata sobre un electrodo de carbón vítreo con incremento de concentración de glucosa y comportamiento respecto al tiempo ( $20 \text{ mV s}^{-1}$  en  $\text{NaOH } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

En las figuras 14, 15 y 16 se observa que la menor variación de intensidad de señal respecto al tiempo corresponde a un depósito con una velocidad de  $10 \text{ mV s}^{-1}$ ; sin embargo, la variación sigue siendo significativa, lo que es indicativo de la pérdida de los óxidos de plata de la superficie del electrodo. En los tres casos las respuestas de cada adición de glucosa no son directamente proporcionales entre sí (Fig. 17).

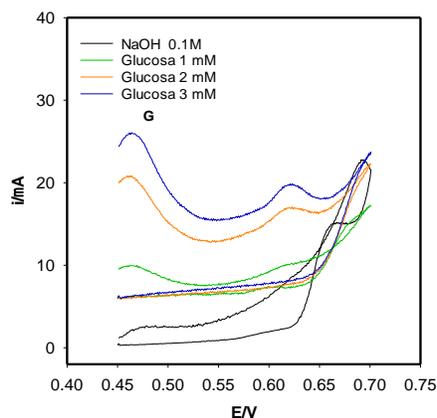


Figura 17. Voltamperograma cíclico de un electrodepósito de plata sobre un electrodo de carbón vítreo con incremento de concentración de glucosa y comportamiento respecto al tiempo a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

### 6.1.5 Cambio de sentido anódico a catódico en el electrodepósito de plata sobre el electrodo de carbón vítreo.

Para evitar que la plata electrodepositada se pierda con el cambio de la solución de  $\text{NH}_4\text{NO}_3/\text{AgNO}_3$  a la solución de NaOH, se modificó la forma de generar el electrodepósito, imponiendo un potencial inicial de 0.35 V e iniciando en sentido anódico hasta 0.70 V para completar el barrido en 0.35 V. Se realizó solo un ciclo para evitar la oxidación de la plata electrodepositada en la superficie del electrodo (Fig. 18).

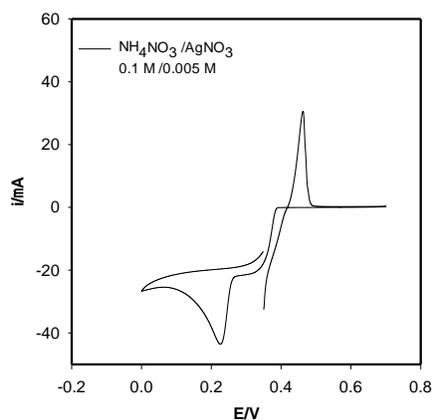


Figura 18. Voltamperograma del electrodepósito de Ag sobre un electrodo de carbón vítreo, primer ciclo a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

A partir de este depósito se hicieron adiciones de glucosa  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  (Fig. 19) observándose una mejor proporción entre los aumentos de intensidad de señal y disminuyendo notablemente la inestabilidad respecto al tiempo (Fig. 20).

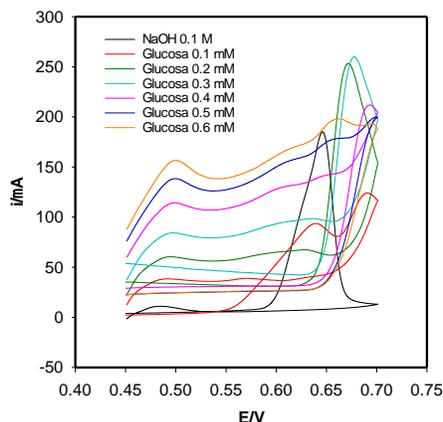


Figura 19. Voltamperograma cíclico de un electrodepósito de plata sobre un electrodo de carbón vítreo con incremento de concentración de glucosa a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

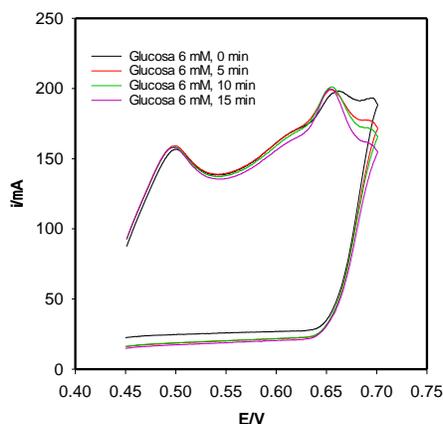


Figura 20. Voltamperograma cíclico que muestra la variación respecto al tiempo de la intensidad de la señal correspondiente a la oxidación de glucosa.

## 6.2 ESTUDIOS CRONOAMPEROMÉTRICOS.

### 6.2.1 Optimización del pH de trabajo.

Se evaluó la respuesta cronoamperométrica del sensor en un intervalo de pH de 11 a 14 para analizar el comportamiento del electrodepósito de plata. La glucosa

no fue detectada a pH 11, lo cual se puede atribuir a una alta solubilidad del  $\text{Ag}_2\text{O}$ , misma que es equivalente a la que se presenta a pH=13 por lo que se sugiere que a pH=11 la velocidad de disolución debe ser significativamente mayor (Figs. 21-23) (Tab. 5).

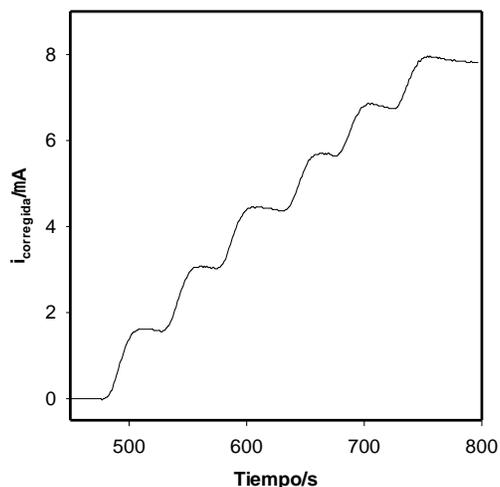


Figura 21. Registro cronoamperométrico de un electrodo de carbón vítreo con electrodepósito de plata para adiciones de glucosa  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ , a pH 12.

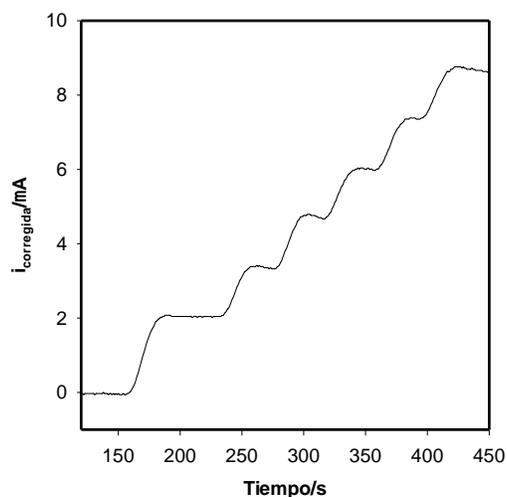


Figura 22. Registro cronoamperométrico de un electrodo de carbón vítreo con electrodepósito de plata para adiciones de glucosa  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ , a pH 13.

EVALUACIÓN DE UN SENSOR NO ENZIMÁTICO CON PELÍCULA DE PLATA PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

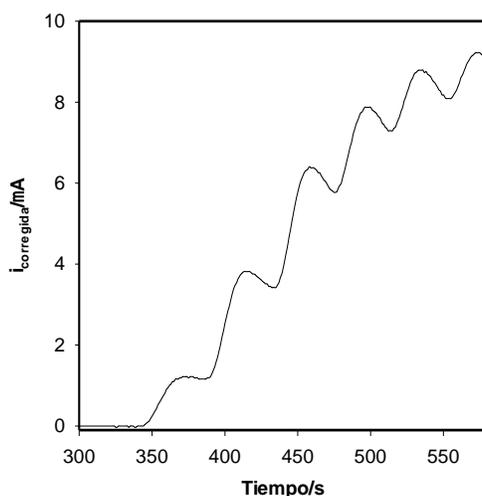


Figura 23. Registro cronoamperométrico de un electrodo de carbón vítreo con electrodepósito de plata para adiciones de glucosa 0.01 mol L<sup>-1</sup>, a pH 14.

Tabla 5. Parámetros analíticos de las curvas de calibrado sucesivas a, b y c de glucosa para pH 12,13 y 14.

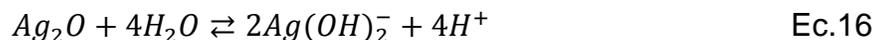
pH	Curva	Sensibilidad ( $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ )	R <sup>2</sup>	Sensibilidad Promedio	DS*	%DSR*
12	a	187.06	0.995	217.11	34.17	15.74
	b	210.00	0.999			
	c	254.29	0.998			
13	a	189.38	0.999	153.01	38.87	25.40
	b	157.60	0.991			
	c	112.04	0.995			
14	a	236.78	0.952	99.172	122.61	41.35
	b	59.22	0.963			
	c	1.51	0.005			

\*DS: Desviación estándar

\*%DS: Porcentaje de desviación estándar

A pH 12 se encuentra la mejor estabilidad coincidiendo con el pH en el que el Ag<sub>2</sub>O<sub>(s)</sub> posee su mínima solubilidad, mientras que a pH 14 se incrementa significativamente la solubilidad al desplazarse el equilibrio (Ec. 16) disminuyendo

la disponibilidad del  $\text{Ag}_2\text{O}_{(s)}$  para la formación de  $\text{AgO}$  y que este pueda reaccionar con la glucosa.



Los resultados obtenidos concuerdan con la información que brinda el Diagrama de Existencia Predominio  $\text{pAg}'$  contra  $\text{pH}$  para  $\text{Ag}'$  (Fig. 24), el cual permite afirmar que a  $\text{pH}$  12 se tiene la mínima solubilidad del  $\text{Ag}_2\text{O}$ . En consecuencia los siguientes experimentos se realizaron en un medio de  $\text{NaOH}$   $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ .

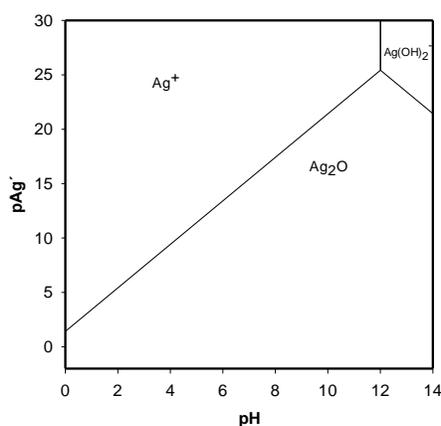


Figura 24. Diagrama de Existencia Predominio para el sistema  $\text{pAg}'$  vs  $\text{pH}$  (consultar datos en anexo).

### 6.2.2 Estudio de la variación de concentración de $\text{AgNO}_3$ en el electrodeposición sobre el electrodo de carbón vítreo.

Una vez encontrada la concentración óptima de  $\text{NaOH}$  ( $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ ) con la cual realizar la oxidación del electrodeposición de plata, se evaluó la concentración de plata utilizada en el electrodeposición. Las concentraciones evaluadas fueron  $5 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $5 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-3}$  y  $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{AgNO}_3$ , obteniendo que la detección más estable para glucosa se genera a partir de soluciones de plata  $1 \times 10^{-2}$  y  $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (Figs. 25 y 26).

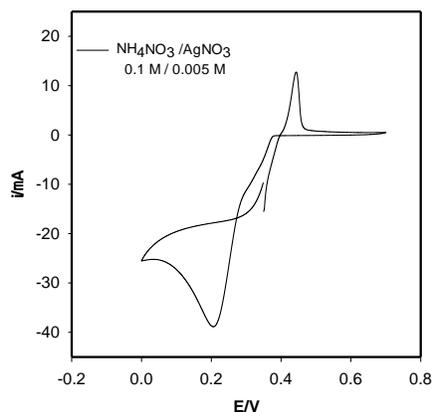


Figura 25. Electrodeposición de Ag sobre un electrodo de carbón vítreo, primer ciclo a  $10 \text{ mV s}^{-1}$  con  $\text{AgNO}_3 5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

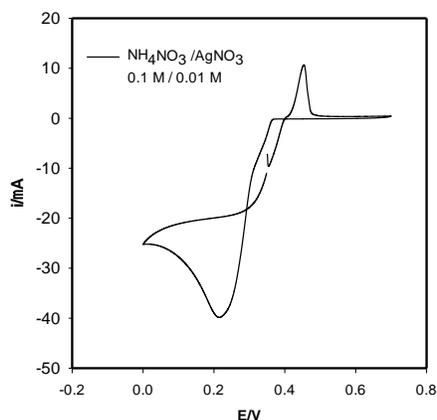


Figura 26. Electrodeposición de Ag sobre un electrodo de carbón vítreo, primer ciclo a  $10 \text{ mV s}^{-1}$  con  $\text{AgNO}_3 1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ .

Cabe mencionar que a concentraciones menores a  $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ , la glucosa no fue detectada por el sistema y a concentraciones mayores de  $1 \times 10^{-2} \text{ M}$  la intensidad de las señales mostraban un perfil desproporcionado entre cada adición y no se lograban estabilizar. A partir de estos experimentos se eligió las concentraciones de  $0.01 \text{ M} / 0.1 \text{ M}$  de  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  respectivamente para realizar el electrodeposición de plata sobre el electrodo de carbón vítreo, obteniéndose los siguientes resultados (Figs. 27 y 28).

EVALUACIÓN DE UN SENSOR NO ENZIMÁTICO CON PELÍCULA DE PLATA PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

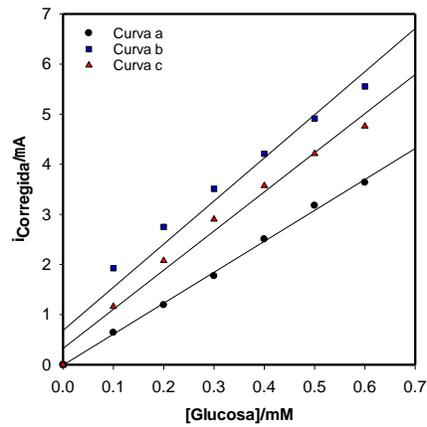


Figura 27. Curvas de calibrado correspondiente los registros cronoamperométricos realizados con electrodeposición de  $\text{AgNO}_3$   $1 \times 10^{-2}$  M.

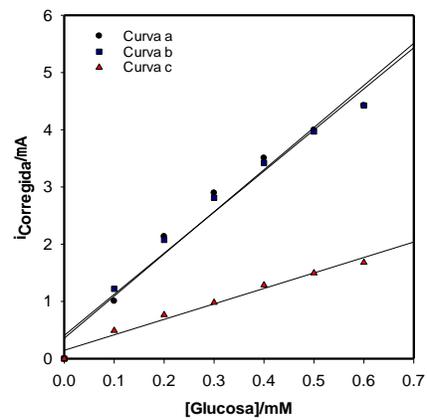


Figura 28. Curvas de calibrado correspondiente los registros cronoamperométricos realizados con electrodeposición de  $\text{AgNO}_3$   $5 \times 10^{-3}$  M.

Tabla 6. Parámetros estadísticos de las curvas de calibrado sucesivas de glucosa a, b y c correspondientes a la figura 27 y 28.

Concentración AgNO <sub>3</sub> (M)	Curva	Sensibilidad ( $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ )	R <sup>2</sup>	Sensibilidad Promedio	DS*	%DSR*
1 X10 <sup>-2</sup>	a	87.36	0.997	106.56	17.55	16.47
	b	121.80	0.958			
	c	110.53	0.984			
5 X10 <sup>-3</sup>	a	104.21	0.968	81.37	37.37	45.92
	b	101.66	0.973			
	c	38.25	0.978			

\*DS: Desviación estándar

\*%DS: Porcentaje de desviación estándar

Los resultados de la Tabla 6 indican variabilidad entre sensibilidades en ambas concentraciones; aunado a ello, las Figuras 25 y 26 nos muestran que en ambas situaciones la plata se encuentra en su forma reducida. Los coeficientes de correlación favorecen a la concentración de 0.01 mol L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub>.

### 6.2.3 Evaluación del potencial de electrodepósito.

Los experimentos anteriores fueron realizados utilizando un electrodepósito potenciodinámico; sin embargo, es importante evaluar el régimen potencioestático a fin de establecer si es posible mejorar los resultados obtenidos hasta el momento y lograr disminuir la variación entre sensibilidades entre las curvas de calibrado. En esta etapa se evaluó el electrodepósito potencioestático a potenciales de 0.20, 0.30 y 0.40 V con un tiempo de 60 segundos.

En los tres potenciales evaluados se sigue observando la tendencia de variación de la sensibilidad entre cada curva, aunque la menor variación entre sensibilidades se presenta en 0.30 V, aunque existe baja diferencia entre las sensibilidades promedio de 0.20 y 0.30 V. Los mejores coeficientes de correlación resultan a 0.20 V (Tab. 7).

Tabla 7. Parámetros analíticos de las curvas de calibrado sucesivas de glucosa en la evaluación de potencial de electrodepósito.

Potencial (V)	Curva	Sensibilidad ( $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ )	R <sup>2</sup>	Sensibilidad Promedio	DS*	%DSR*
<b>0.200</b>	a	113.33	0.989	220.89	97.36	44.07
	b	246.30	0.993			
	c	303.02	0.993			
<b>0.300</b>	a	195.39	0.962	230.78	31.72	13.74
	b	240.26	0.991			
	c	256.68	0.993			
<b>0.400</b>	a	101.00	0.996	121.89	24.53	20.12
	b	115.76	0.908			
	c	148.91	0.891			

\*DS: Desviación estándar

\*%DSR: Porcentaje de desviación estándar

#### 6.2.4 Evaluación de tiempo de electrodepósito y preoxidación.

La preoxidación es un proceso que se incluyó para mejorar la estabilidad de la respuesta del sensor; consiste en aplicar un potencial de 0.60 V donde se lleva a cabo la oxidación de la plata de manera previa a la obtención de las curvas de calibración.

Con la finalidad de disminuir la variación entre cada curva realizada, el electrodepósito, la preoxidación y las lecturas de glucosa se realizaron por separado de manera potencioestática, evaluando los tiempos de los procesos de electrodepósito y preoxidación. En primera instancia se fijó un tiempo de preoxidación de 900 segundos, para el segundo experimento el tiempo de electrodepósito de plata se mantuvo constante en 60 segundos.

EVALUACIÓN DE UN SENSOR NO ENZIMÁTICO CON PELÍCULA DE PLATA PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

Tabla 8. Parámetros analíticos de las curvas de calibrado sucesivas de glucosa a, b y c para diferentes tiempos de electrodeposición (tiempo de preoxidación = 900 s).

Tiempo (s)	Curva	Sensibilidad ( $\mu\text{A mM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ )	R <sup>2</sup>	Sensibilidad Promedio	DS*	%DSR*
30	a	309.01	0.901	352.88	44.66	12.65
	b	398.29	0.971			
	c	351.35	0.972			
45	a	216.51	0.957	308.45	79.80	25.87
	b	359.89	0.973			
	c	348.94	0.988			
60	a	200.45	0.995	329.82	113.41	34.38
	b	376.89	0.980			
	c	412.11	0.969			
90	a	421.71	0.930	339.84	82.56	24.29
	b	341.20	0.951			
	c	256.61	0.966			

\*DS: Desviación estándar; \*%DSR: Porcentaje de desviación estándar

Tabla 9. Parámetros analíticos de las curvas de calibrado sucesivas de glucosa a, b y c para diferentes tiempos de preoxidación (tiempo de electrodeposición = 60 s).

Tiempo (s)	Curva	Sensibilidad ( $\mu\text{A mM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ )	R <sup>2</sup>	Sensibilidad Promedio	DS*	%DSR*
600	a	329.502	0.816	187.902	122.660	65.279
	b	119.830	0.792			
	c	114.373	0.917			
900	a	228.848	0.984	346.969	112.658	32.469
	b	358.836	0.993			
	c	453.224	0.992			
1200	a	417.146	0.883	290.453	112.986	38.903
	b	253.986	0.957			
	c	200.173	0.983			

\*DS: Desviación estándar; \*%DSR: Porcentaje de desviación estándar

A partir de los resultados mostrados en las tablas 8 y 9 se seleccionó un tiempo de 60 segundos para la formación del electrodepósito y 900 segundos para la peroxidación del mismo. A pesar del alto porcentaje de desviación estándar se conserva la tendencia de aumento entre sensibilidades.

### 6.2.5 Evaluación de la reproducibilidad.

Para evaluar la reproducibilidad entre diferentes curvas de calibración de glucosa con diferentes electrodepósitos de plata obtenidos bajo las mismas condiciones, se realizaron curvas de calibración de glucosa en el intervalo de concentraciones de 0.1 a 0.6 mM (Tab. 10). Los resultados muestran un alto porcentaje de desviación estándar relativa reflejando la baja reproducibilidad que existe entre diferentes electrodepósitos.

Tabla 10. Parámetros analíticos de curvas de calibrado de glucosa de distintos electrodepósito.

Electrodepósito	Sensibilidad ( $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ )	R <sup>2</sup>
1	259.069	0.9907
2	363.964	0.9934
3	384.677	0.9896
4	477.561	0.9579
5	668.223	0.9959
<b>Promedio</b>	430.699	
<b>DS*</b>	153.820	
<b>%DSR*</b>	35.714	

\*DS: Desviación estándar

\*%DSR: Porcentaje de desviación estándar

Al evaluar la reproducibilidad entre curvas utilizando un sólo electrodepósito, la reproducibilidad mejora significativamente, disminuyendo el porcentaje de desviación estándar (Tab.11), aunque el sistema sigue demostrando una baja reproducibilidad intrínseca.

Tabla 11. Parámetros analíticos de las curvas de calibrado sucesivas de glucosa sobre un mismo electrodepósito.

Curva	Sensibilidad ( $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ )	R <sup>2</sup>
1	383.220	0.991
2	406.055	0.992
3	407.470	0.992
4	410.526	0.988
5	455.447	0.987
6	456.310	0.989
7	462.012	0.988
8	463.002	0.989
<b>Promedio</b>	430.505	
<b>DS*</b>	31.848	
<b>%DSR*</b>	7.398	

\*DS: Desviación estándar; \*%DSR: Porcentaje de desviación estándar

Con base en los estudios realizados anteriormente se establece que las condiciones óptimas para realizar la determinación de glucosa con el electrodepósito de plata son las siguientes: el electrodepósito de plata se realiza en  $\text{AgNO}_3/\text{NH}_4\text{NO}_3$  de concentración 0.01/ 0.1 mol L<sup>-1</sup> en régimen potencioestático a un potencial de 0.20 V por 60 segundos; para la preoxidación se requiere de NaOH de concentración 0.01 mol L<sup>-1</sup> en régimen potencioestático a 0.60 V por 900 segundos.

### 6.2.6 Intervalo de concentración y parámetros analíticos.

Se evaluaron diferentes intervalos de concentración de glucosa para conocer la sensibilidad del sistema propuesto, obteniendo bajos coeficientes de correlación, lo cual indica una baja relación entre los datos, en los intervalos menores a 0.1 mM, además la comparación de valores promedio de pendientes nos señala que los intervalos son diferentes entre sí.

A partir de las observaciones anteriores, los parámetros analíticos se obtuvieron en concentraciones mayores a 0.1 mM; a pesar de la buena correlación que se obtiene en la curva de calibrado, ésta presenta una ordenada al origen de  $0.651 \pm$

0.274  $\mu\text{A}$ , la cual, por prueba t de student, es diferente de cero indicándonos errores en nuestro sistema (Fig. 29) (Tab. 12).

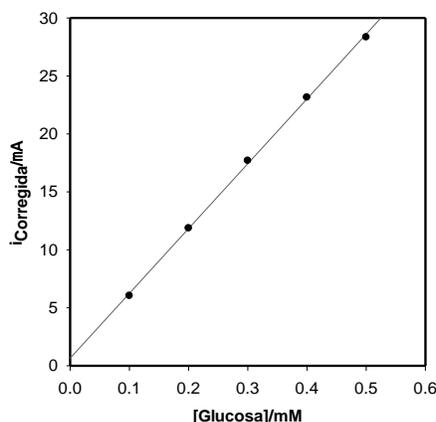


Figura 29. Curva de calibrado de Glucosa sobre un electrodo de carbón vítreo con electrodepósito de plata.

Tabla 12. Parámetros analíticos de una curva de calibrado de Glucosa.

Nº datos	LOD ( $\text{mmolL}^{-1}$ )	LOQ ( $\text{mmolL}^{-1}$ )	Sensibilidad ( $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ )	$R^2$	Intervalo lineal ( $\text{mmol/L}^{-1}$ )
5	0.026	0.058	791.03 $\pm 0.826$	0.999	0.1- 0.5

\*LOD: Límite de detección; \*LOQ: Límite de cuantificación

## 6.2.7 Evaluación de Interferencias

Con la finalidad de evaluar la selectividad del sensor a la glucosa se realizó el estudio de interferencias, tomando en cuenta los componentes de algunos productos comerciales.

Los interferentes evaluados fueron fructosa, lactosa y ácido ascórbico, debido a que en el caso de las dos primeras especies se habla de azúcares reductores al igual que la glucosa y en el caso del ácido ascórbico se ha reportado que es una especie electroactiva además de que tiende a adsorberse en la superficie del electrodo, modificando las características del mismo [3,55].

Los interferentes fueron evaluados en relación 10 veces mayor, 10 menor y de igual concentración con respecto a la glucosa. La selectividad encontrada es muy modesta; particularmente cuando las concentraciones de lactosa, fructosa y ácido ascórbico son iguales o 10 veces mayores (Fig. 30).

## EVALUACIÓN DE UN SENSOR NO ENZIMÁTICO CON PELÍCULA DE PLATA PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

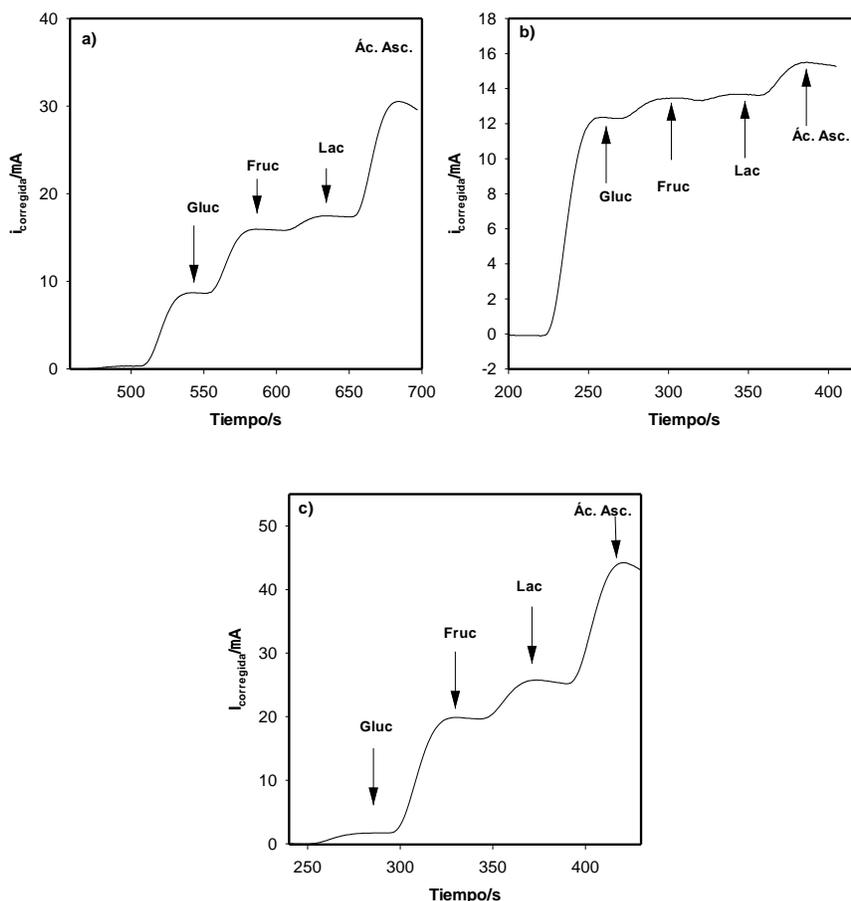


Figura 30. Efecto de las interferencias en la cuantificación de glucosa con electrodo de carbón vítreo con electrodeposición de plata, a) concentraciones iguales de glucosa e interferentes, b) concentración de glucosa diez veces mayor que la concentración de interferentes y c) concentración de glucosa diez veces menor que la concentración de interferentes.

Tabla 13. Estudio de coeficientes de selectividad para distintos interferentes para un electrodo de carbón vítreo con electrodeposición de plata utilizado para la detección de glucosa.

Interferente	$K_{G=l}$	$K_{G>l}$	$K_{G<l}$
Fructosa	0.78	0.08	9.95
Lactosa	0.12	0.02	3.49
Ácido ascórbico	0.97	0.12	9.96

\*l: interferente.

Los resultados indican una respuesta ocho veces mayor por parte de la glucosa frente a la lactosa cuando estos azúcares se encuentran en igual concentración (Tab. 13). En el caso de la fructosa y el ácido ascórbico, bajo las mismas condiciones de concentración, la respuesta del electrodo con electrodepósito de plata resulta ser similar a la de la glucosa; en condiciones de concentración de glucosa diez veces mayor a la de los interferentes evaluados, las repuestas resultan ser solo 12, 50 y 8 veces mayor para la glucosa respecto a la fructosa, lactosa y el ácido ascórbico, respectivamente.

Estos resultados demuestran que no existe buena selectividad hacia la glucosa por parte del electrodepósito de plata frente a los interferentes evaluados.

### 6.2.8 Cuantificación de glucosa en muestras comerciales.

Utilizando el método de adición estándar se procedió a la determinación de glucosa por triplicado de dos muestras comerciales un electrolito comercial y suero glucosado al 5%.

Con la finalidad de evaluar los resultados se realizó el contraste de la media de concentración obtenida contra el valor reportado en los marbetes de los productos mediante una prueba t para un nivel de confianza del 95%.

#### 6.2.8.1 Electrolito comercial (Muestra 1).

Para la cuantificación de glucosa se obtuvo un electrolito comercial saborizado del cual se preparó una dilución a concentración  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  aproximadamente, posteriormente para la cuantificación cronoamperométrica, se colocó una alícuota de la dilución anterior en una solución de NaOH  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  y se realizaron adiciones sucesivas de glucosa estándar  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ . (§ 5.6)

Los resultados obtenidos mediante el registro cronoamperométrico fueron graficados en una curva de  $i_{\text{Corregida}}$  vs [Glucosa] (Fig. 31), para su posterior análisis y determinación de la concentración de la muestra.

Tabla 14. Comparación entre concentración reportada por el fabricante y la obtenida utilizando un electrodo de carbón vítreo con electrodepósito de plata (Muestra 1).

<b>Electrolito</b>	
<b>Concentración en marbete (g/100 mL)</b>	5
<b>Concentración por técnica propuesta (g/100 mL)</b>	5.49±0.14
<b>t<sub>Exp</sub></b>	5.84

\*T<sub>crit</sub>:4.30; n=3

A partir de los resultados obtenidos (Tab. 14) y la comparación mediante el estadístico t se concluye que sí existe una diferencia significativa entre la concentración calculada y la reportada en el marbete; esta diferencia se atribuye a las sustancias presentes en la matriz del analito, como es el caso del lactato, del saborizante utilizado en la bebida y del alto contenido de iones cloruros en la muestra.

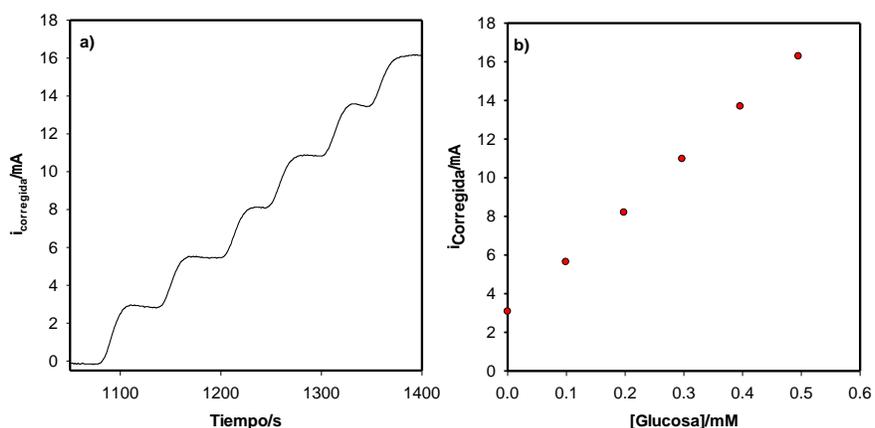


Figura 31. a) Registro cronoamperométrico para una adición de 0.1 mL de dilución  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  de muestra 1 en 10 mL de  $\text{NaOH } 0.01 \text{ mol L}^{-1}$  más cinco adiciones de glucosa estándar  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  sobre un electrodo de carbón vítreo con electrodeposición de plata a  $E=0.60 \text{ V}$ . b) Curva de adición estándar correspondiente al registro cronoamperométrico.

### 6.2.8.2 Suero glucosado al 5% (Muestra 2).

Bajo el mismo procedimiento reportado en el apartado 5.2.8.2 se realizó la determinación del analito en una solución comercial de suero glucosado al 5%, muestra que no contiene interferentes.

EVALUACIÓN DE UN SENSOR NO ENZIMÁTICO CON PELÍCULA DE PLATA PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

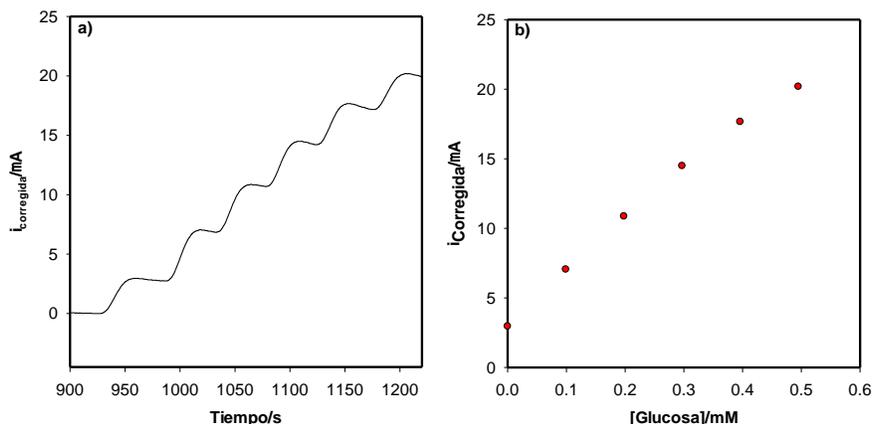


Figura 32. a) Registro cronoamperométrico para una adición de 0.1 mL de dilución  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  de muestra 2 en 10 mL de  $\text{NaOH } 0.01 \text{ mol L}^{-1}$  más cinco adiciones de glucosa estándar  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  sobre un electrodo de carbón vítreo con electrodeposición de plata a  $E=0.60 \text{ V}$ . b) Curva de adición estándar correspondiente al registro cronoamperométrico.

Tabla 15. Comparación entre concentración reportada por el fabricante y la obtenida utilizando un electrodo de carbón vítreo con electrodeposición de plata. Muestra 2.

<b>Solución de glucosa al 5%</b>	
<b>Concentración en marbete (g/100 mL)</b>	5.00
<b>Concentración por técnica propuesta (g/100 mL)</b>	$5.07 \pm 0.05$
<b><math>t_{\text{Exp}}</math></b>	2.3

\* $T_{\text{crit}}$ :4.30; n=3

De acuerdo a los resultados reportados en la Tabla 15 y haciendo una comparación mediante el estadístico t, se establece que no existe una diferencia significativa entre la concentración calculada y la reportada en el marbete de la solución; este resultado confirma que el electrodeposición de plata sobre carbón vítreo es útil para la determinación de glucosa en muestras simples que no contengan interferencias electroactivas.

## 7 CONCLUSIONES

1. Mediante la caracterización por voltamperometría cíclica de los óxidos de plata generados sobre electrodepositos de plata sobre carbón vítreo, fue posible identificar las señales correspondientes a la formación del AgO y la oxidación de glucosa.
2. Se observó que parámetros como la concentración de plata, la velocidad de barrido en el electrodeposito potenciodinámico y el tiempo de formación del electrodeposito potencioestático, están relacionados con la estabilidad de las películas de plata obtenidas.
3. El depósito potencioestático a 0.2 V, brindó la mayor estabilidad debido a que al imponer este potencial, la película de plata fue más estable y reproducible. El potencial de trabajo en el cual se forma la especie oxidante de AgO sobre el electrodeposito fue de 0.600 V.
4. Para minimizar la pérdida por solubilidad de los óxidos de plata fue necesaria la modificación del pH de trabajo, encontrando congruencia entre el DEP (donde se minimiza la solubilidad del Ag<sub>2</sub>O) y el estudio del efecto del pH en las curvas de calibración, obteniendo en pH = 12 el menor porcentaje de desviación estándar y máxima sensibilidad.
5. La baja reproducibilidad entre curvas de calibrado se asocia a las diferencias estructurales de los electrodepositos obtenidos debido a factores como el pulido del electrodo y el cambio de solución electropulido-detección. Este error es reducido en la cuantificación de glucosa por medio del método adición estándar.
6. El método resultó ser selectivo para la detección y cuantificación de glucosa cuando en el sistema se encuentran especies interferentes como la fructosa, lactosa y ácido ascórbico en una concentración diez veces menor respecto al analito.
7. El sensor propuesto para la cuantificación de glucosa utilizando un electrodo de carbón vítreo con electrodeposito de plata, es una alternativa analítica de utilidad en muestras simples que no contengan especies electroactivas susceptibles de oxidarse a 0.6 V.

## 8 ANEXO

Tabla A. Constantes de formación de especies de Ag(I) [14].

Especie	$\log \beta_1$	$\log \beta_2$
$\text{Ag}(\text{OH})_n$	2.0	3.99
$\text{Ag}_2\text{O}_{(s)}$	15.42	
$\text{Ag}(\text{NH}_3)_n$	3.4	7.46
$\text{NH}_4^+$	9.4	

Tabla B. Equilibrios representativos del DEP pH contra pAg' para  $\text{Ag}_{(s)}$ . Equilibrio generalizado  $\text{Ag}' \rightleftharpoons \text{Ag}'_{(s)}$ .

pH		pAg
0 - 12	$2 \text{Ag}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Ag}_2\text{O} + 2\text{H}^+$	$1.42 + 2\text{pH}$
12 - 12.01	$2 \text{Ag}(\text{OH}) \rightleftharpoons \text{Ag}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$	25.42
12.01 - 14	$2 \text{Ag}(\text{OH})_2^- + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Ag}_2\text{O} + 3 \text{H}_2\text{O}$	$49.44 - 2\text{pH}$

Diagrama B-1 Diagrama de Zonas de Predominio para  $\text{Ag}'$ .

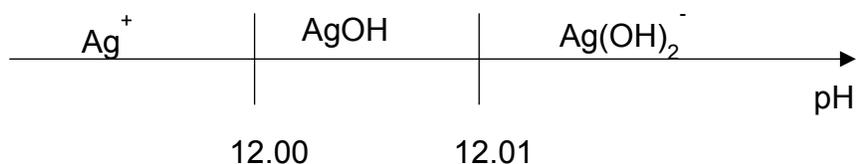


Tabla C. Equilibrios representativos del DZP  $\text{pNH}_3'$  contra pH para  $\text{Ag}(\text{I})''$ . Equilibrio generalizado  $\text{Ag}' + \text{NH}_3' \rightleftharpoons \text{Ag}(\text{NH}_3)_2'$ .

pH		$\text{pNH}_3'$
0 - 9.4	$\text{Ag}^+ + 2 \text{NH}_4^+ \rightleftharpoons \text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+ + 2 \text{H}^+$	$-11.34 + 2\text{pH}$
9.4 - 12	$\text{Ag}^+ + 2 \text{NH}_3 \rightleftharpoons \text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$	7.46
12 - 12.01	$\text{Ag}(\text{OH}) + 2 \text{NH}_3 + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+ + \text{H}_2\text{O}$	$19.46 - \text{pH}$
12.01 - 14	$\text{Ag}(\text{OH})_2^- + 2 \text{NH}_3 + 2 \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+ + 2 \text{H}_2\text{O}$	$31.47 - 2\text{pH}$

Diagrama C-1 Diagrama de Zonas de Predominio para  $\text{NH}_3$ .

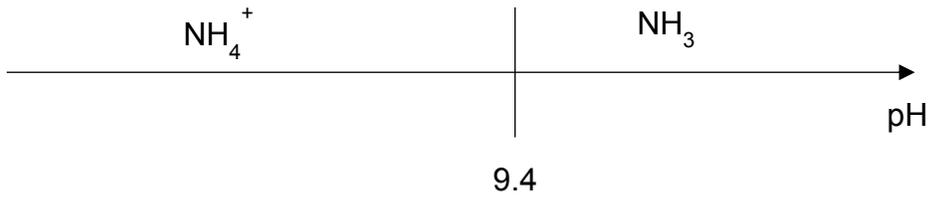


Diagrama C-2 Diagrama de Zonas de Predominio para  $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$ .

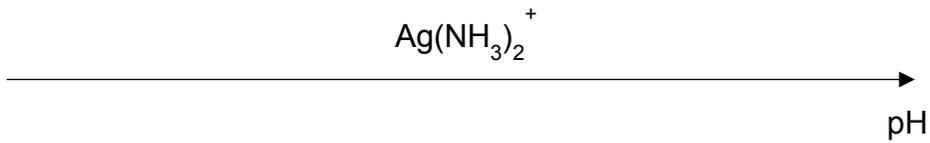
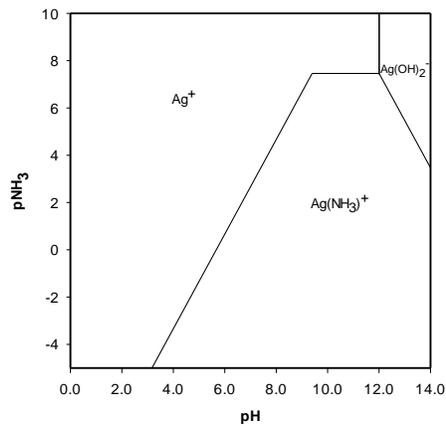


Diagrama C-2 Diagrama de Zonas de Predominio para  $\text{Ag}(\text{NH}_3)^+$ .



## 9 REFERENCIAS

- [1] "Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus en la atención". Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010. Diario Oficial de la Federación, 23 de noviembre de 2010.
- [2] Z. Herrasti Sainz. Superficies nanoestructuradas para el desarrollo de biosensores electroquímicos e integración en un sistema de detección portable. (Tesis doctoral) Universidad Autónoma de Barcelona, 2015, España.
- [3] N. Peña García. Biosensores amperométricos compositos basados en peroxidasa. Aplicación a la determinación de analitos de interés en alimentos mediante electrodos bienzimáticos y multienzimáticos (Tesis doctoral) Universidad Complutense de Madrid, 2003, España.
- [4] P. Hernández Martínez. Aplicación de técnicas electroquímicas en sistemas clínicos y piroquímicos. (Tesis doctoral) Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 2013, México.
- [5] Nelson, D. L. Cox, M. M. Lehninger: Principios de bioquímica. 6a edición. Omega, México, 2015.
- [6] A. Osornio Villa. Oxidación electroquímica de glucosa con nanopartículas de oro soportadas en pasta de grafito/carbón. (Tesis de Maestría) Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, 2017, México.
- [7] Murray, R. K. Bender, D. A. Botham, K. M. Harper: bioquímica ilustrada 28a edición. McGraw-Hill, China, 2010.
- [8] "Características de las defunciones registradas en México durante 2017". INEGI, 31 de octubre de 2018.
- [9] A. L. Galant, R. C. Kaufman y J. D. Wilson. Glucose: detection and analysis. Food Chemistry, 188 (2015) 149-160.
- [10] R. Singh, A. Singh y S. Sachan. Enzymes Used in the Food Industry: Friends or Foes?. Enzymes in Food Biotechnology. Academic Press. (2001) 827-843.
- [11] C. Y. Lee. High-performance anion-exchange chromatography for carbohydrate analysis. Analytical biochemistry, 189 (1990) 151-162.
- [12] E. Giannoccaro, J. Y. Wang, y P. Chen. Comparison of two HPLC systems and an enzymatic method for quantification of soybean sugars. Food Chemistry, 106 (2008) 324-330.

- [13] M. G. Sarrió, S. R. Sánchez y A. M. Ortiz. Análisis de carbohidratos bioactivos mediante cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC). *Cromatografía y técnicas afines*, 35 (2014) 47-58.
- [14] Daniel, H. C. Análisis químico cuantitativo 6a edición. Reverté, España, 2007.
- [15] J. R. Stetter, W. R. Penrose y S. Yao. Sensors, chemical sensors, electrochemical sensors, and ECS. *Journal of The Electrochemical Society*, 150 (2003) S11-S16.
- [16] E. H. Yoo, y S. Y. Lee. Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice. *Sensors*, 10 (2010) 4558-4576.
- [17] Wang. Electrochemical glucose biosensors. *Chemical reviews*, 108 (2008) 814-825.
- [18] S. Dede. Y F. Altay. Biosensors from the First Generation to Nanobiosensors. *International Advanced Researches and Engineering Journal*, 2 (2018) 200-207.
- [19] W. Putzbach. y N. J. Ronkainen. Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: A review. *Sensors*, 13 (2013) 4811-4840.
- [20] Y. Holade, S. Tingry, K. Servat, T. W. Napporn, D. Cornu y K. B. Kokoh. Nanostructured inorganic materials at work in electrochemical sensing and biofuel cells. *Catalysts*, 7 (2017) 1-42.
- [21] C. Chen, Q. Xie, D. Yang, H. Xiao, Y. Fu, Y. Tan y S. Yao. Recent advances in electrochemical glucose biosensors: a review. *RSC Advances*. 3 (2013) 4473-4491.
- [22] W. Zhang, G. Li. Third-generation biosensors based on the direct electron transfer of proteins. *Analytical sciences* 20 (2004) 603-609.
- [23] N. White. Intelligent sensors. *Sensor Review*, 17 (1997) 97 - 98.
- [24] O. Anjos, M. G. Campos, P.C. Ruiz, y P. Antunes. Application of FTIR-ATR spectroscopy to the quantification of sugar in honey. *Food chemistry*, 169 (2015) 218-223
- [25] K. E. Toghill, y R. G. Compton. Electrochemical non-enzymatic glucose sensors: a perspective and an evaluation. *Int. J. Electrochem. Sci*, 5 (2010) 1246-1301.
- [26] B. E. Conway. Electrochemical oxide film formation at noble metals as a surface-chemical process. *Progress in surface science*, 49 (1995) 331-452.

- [27] G. Wang, X. He, L. Wang, A. Gu, Y. Huang, B. Fang y X. Zhang. Non-enzymatic electrochemical sensing of glucose. *Microchimica Acta*, 180 (2013) 161-186.
- [28] G. H. Wu, X. H. Song, Y. F. Wu, X. M. Chen, F. Luo y X. Chen. Non-enzymatic electrochemical glucose sensor based on platinum nanoflowers supported on graphene oxide. *Talanta*, 105 (2013) 379-385.
- [29] M. R. Guascito, D. Chirizzi, C. Malitesta, M. Siciliano, T. Siciliano y A. Tepore. Amperometric non-enzymatic bimetallic glucose sensor based on platinum tellurium microtubes modified electrode. *Electrochemistry Communications*, 22 (2012) 45-48.
- [30] J. Li, R. Yuan, Y. Chai, X. Che, W. Li y X. Zhong. Nonenzymatic glucose sensor based on a glassy carbon electrode modified with chains of platinum hollow nanoparticles and porous gold nanoparticles in a chitosan membrane. *Microchimica Acta*, 172 (2011) 163-169.
- [31] C. H. Chou, J. C. Chen, C. C. Tai, I. W. Sun y J. M. Zen. A Nonenzymatic Glucose Sensor Using Nanoporous Platinum Electrodes Prepared by Electrochemical Alloying/Dealloying in a Water- Insensitive Zinc Chloride- 1-Ethyl- 3- Methylimidazolium Chloride Ionic Liquid. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 20 (2008) 771-775.
- [32] S. Park, T. D. Chung y H. C. Kim. Nonenzymatic glucose detection using mesoporous platinum. *Analytical chemistry*, 75 (2003) 3046-3049.
- [33] N. S. Ismail, Q. H. Le, H. Yoshikawa, M. Saito y E. Tamiya. Development of non-enzymatic electrochemical glucose sensor based on graphene oxide nanoribbon-gold nanoparticle hybrid. *Electrochimica acta*, 146 (2014) 98-105.
- [34] S. Cherevko y C. H. Chung. Gold nanowire array electrode for non-enzymatic voltammetric and amperometric glucose detection. *Sensors and Actuators B*, 142 (2009) 216-223.
- [35] H. Shu, L. Cao, G. Chang, H. He, Y. Zhang y Y. He. Direct electrodeposition of gold nanostructures onto glassy carbon electrodes for non-enzymatic detection of glucose. *Electrochimica Acta*, 132 (2014) 524-532.
- [36] R. A. Soomro, O. P. Akyuz, R. Ozturk y Z. H. Ibupoto. Highly sensitive non-enzymatic glucose sensing using gold nanocages as efficient electrode material. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 233 (2016) 230-236.

- [37] Y. Li, Y. Y. Song, C. Yang y X. H. Xia. Hydrogen bubble dynamic template synthesis of porous gold for nonenzymatic electrochemical detection of glucose. *Electrochemistry Communications*, 9 (2007) 981-988.
- [38] Y. Zhang, L. Su, D. Manuzzi, H. V. E. de los Monteros, W. Jia, D. Huo y Y. Lei. Ultrasensitive and selective non-enzymatic glucose detection using copper nanowires. *Biosensors and Bioelectronics*, 31 (2012) 426-432.
- [39] A. A. Ensafi, M. M. Abarghoui y B. Rezaei. A new non-enzymatic glucose sensor based on copper/porous silicon nanocomposite. *Electrochimica Acta*, 123 (2014) 219-226.
- [40] F. Sun, L. Li, P. Liu y Y. Lian. Nonenzymatic electrochemical glucose sensor based on novel copper film. *Electroanalysis*, 23 (2011) 395-401.
- [41] J. Yang, W. D. Zhang y S. Gunasekaran. An amperometric non-enzymatic glucose sensor by electrodepositing copper nanocubes onto vertically well-aligned multi-walled carbon nanotube arrays. *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2010) 279-284.
- [42] V. Vinoth, T. D. Shergilin, A. M. Asiri, J. J. Wu y S. Anandan. Facile synthesis of copper oxide microflowers for nonenzymatic glucose sensor applications. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 82 (2018) 31-38.
- [43] M. Palomar- Pardavé, M. T. Ramírez, I. González, A. Serruya y B. R. Scharifker. Silver electrocrystallization on vitreous carbon from ammonium hydroxide solutions. *Journal of the Electrochemical Society*, 143 (1996) 1551.
- [44] I. G. Casella y M. Ritorti. Electrodeposition of silver particles from alkaline aqueous solutions and their electrocatalytic activity for the reduction of nitrate, bromate and chlorite ions. *Electrochimica acta*, 55 (2010) 6462-6468.
- [45] R. Taft y E. N. Hiebert. The Electrodeposition of silver from solutions of silver nitrate in the presence of wetting agents. *Transactions of the Kansas Academy of Science*, 46 (1943) 142-160.
- [46] L. Shahriary y A. A. Athawale. Electrochemical deposition of silver/silver oxide on reduced graphene oxide for glucose sensing. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 19 (2015) 2255-2263.
- [47] A. C. Joshi, G. B. Markad y S. K. Haram. Rudimentary simple method for the decoration of graphene oxide with silver nanoparticles: Their application for the amperometric detection of glucose in the human blood samples. *Electrochimica Acta*, 161 (2015) 108-114.

- [48] P. Stonehart y F. P. Portante. Potentiodynamic examination of surface processes and kinetics for the  $\text{Ag}_2\text{O}/\text{AgO}/\text{OH}^-$  system. *Electrochimica Acta*, 13 (1968) 1805-1814.
- [49] S. Wu, H. Zhao, H. Ju, C. Shi y J. Zhao. Electrodeposition of silver–DNA hybrid nanoparticles for electrochemical sensing of hydrogen peroxide and glucose. *Electrochemistry Communications*, 8 (2006) 1197-1203.
- [50] T. P. Tougas, M. J. Debenedetto y J. M. Demott Jr. Postchromatographic electrochemical detection of carbohydrates at a silver oxide electrode. *Electroanalysis*, 5 (1993) 669-675.
- [51] H. Quan, S. U. Park y J. Park. Electrochemical oxidation of glucose on silver nanoparticle-modified composite electrodes. *Electrochimica Acta*, 55 (2010) 2232-2237.
- [52] A. A. Ensafi, N. Zandi-Atashbar, B. Rezaei, M. Taghizadeh y M. Ghiaci. Silver nanoparticles decorated carboxylate functionalized  $\text{SiO}_2$ , New nanocomposites for non-enzymatic detection of glucose and hydrogen peroxide. *Electrochimica Acta*, 214 (2016) 208-216.
- [53] B. Zheng, G. Liu, A. Yao, Y. Xiao, J. Du, Y. Guo, D. Xiao, Q. Hu y M. M.F. Choi. A sensitive AgNPs/CuO nanofibers non-enzymatic glucose sensor based on electrospinning technology. *Sensors and Actuators B* 195 (2014) 431-438."
- [54] A. A. Ensafi, N. Zandi-Atashbar, B. Rezaei, M. Ghiaci, M. E. Chermahini y P. Moshiri. Non-enzymatic glucose electrochemical sensor based on silver nanoparticle decorated organic functionalized multiwall carbon nanotubes. *RSC advances*, 6 (2016) 60926-60932.
- [55] M. Baghayeri, A. Amiri y S. Farhadi. Development of non-enzymatic glucose sensor based on efficient loading Ag nanoparticles on functionalized carbon nanotubes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 225 (2016) 354-362.