



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

MAESTRÍA EN QUÍMICA

TESIS

PLATAFORMAS VOLTAMPEROMÉTRICAS DE pH
PARA EL DESARROLLO DE SENSORES
ELECTROQUÍMICOS

Para obtener el grado de

Maestro en Química

PRESENTA

Q. JOSUÉ GRIJALVA CANALES

DIRECTOR

Dr. Carlos Andrés Galán Vidal

Mineral de la Reforma, Hgo., México, Marzo 2025



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

School of Engineering and Basic Sciences

Área Académica de Química

Department of Chemistry

Número de control: ICBI-AAQ/781/2025

Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar
Presente.

El Comité Tutorial de la **Tesis de Maestría** titulada **“Plataformas voltamperométricas de pH para el desarrollo de sensores electroquímicos”**, realizada por el sustentante **Josué Grijalva Canales** con número de cuenta **313523** perteneciente al programa de **Maestría en Química**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

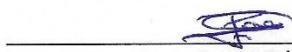
Por lo que el sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente
“Amor, Orden y Progreso”
Mineral de la Reforma, Hidalgo a 22 de abril de 2025

El Comité Tutorial


Dr. Carlos Andrés Galán Vidal
Director de Tesis


Dra. María Elena Páez Hernández

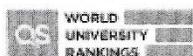

Dra. Irma Pérez Silva


Dr. Israel Samuel Ibarra Ortega


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Área Académica de Química

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. 40088, 40087
aaq_icbi@uaeh.edu.mx, nandrade@uaeh.edu.mx

“Amor, Orden y Progreso”



2025



uaeh.edu.mx

Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio uno del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo bajo la dirección del Dr. Carlos Andrés Galán Vidal.

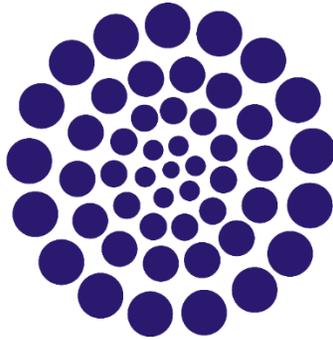
Parte de este trabajo ha sido presentado en:

XXXV Congreso Nacional de Química Analítica y XXV Simposio Estudiantil (18 al 22 de septiembre de 2023), con el trabajo titulado: “Biosensor monoenzimático de triglicéridos basado en un sensor voltamperométrico de pH”, en modalidad oral. Asociación Mexicana de Química Analítica. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

XXXVI Congreso Nacional de Química Analítica y XXVI Simposio Estudiantil (12 al 16 de agosto de 2024), con el trabajo titulado: “Contribuciones a la caracterización electroquímica de dopamina y polidopamina”, en modalidad oral. Asociación Mexicana de Química Analítica. Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.

Parte de este trabajo se ha publicado en:

Josué Grijalva Canales, Carlos Andrés Galán Vidal, María Elena Páez Hernández, Irma Pérez Silva, Israel Samuel Ibarra Ortega, José Antonio Rodríguez Ávila. “Contribuciones a la caracterización electroquímica de dopamina y polidopamina”. Teoría y Aplicaciones de la química analítica en México, 96-108 (2), 2024. <https://taqam.amqa.org.mx/wp-content/uploads/2024/12/No.-2-TAQAM-2024.pdf>



CONACYT

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) por la beca otorgada para realizar estudios de Maestría. CVU: 1265164

Agradecimientos

A mis padres, Elena Canales Ortega y Margarito Grijalva Hernández, por todo su amor, su apoyo y sus palabras de aliento.

-Mis hombros de gigantes-

A mi director de tesis, el Dr. Carlos Andrés Galán Vidal, por aceptarme para el trabajo en laboratorio desde licenciatura, por su tiempo, comentarios y enseñanza para la realización de este proyecto.

A mi comité tutorial, la Dra. María Elena Páez Hernández, la Dra. Irma Pérez Silva y el Dr. Israel Samuel Ibarra Ortega, por su apoyo, comentarios y sugerencias para la realización de este proyecto.

Contenido

Contenido	VI
Abreviaturas	IX
Índice de figuras	X
Índice de tablas	XIV
Capítulo I: Introducción	2
Capítulo II: Antecedentes	4
2.1. pH	5
2.1.1. Medición de pH.....	6
2.2. Sensores de pH	7
2.2.1 Indicadores de pH	7
2.2.2 Tiras de pH	8
2.2.3 Sensores ópticos de pH.....	8
2.2.4 Sensores másicos de pH	8
2.2.5 Sensores electroquímicos de pH.....	10
2.2.6 Sensores de pH como transductores	10
2.3. Sensores electroquímicos de pH	14
2.3.1. Sensores potenciométricos	14
2.3.2 Sensores amperométricos	14
2.3.3 Sensores voltamperométricos.....	15
Capítulo III: Objetivos.....	19
3.1 Objetivo general	20
3.2 Objetivos específicos	20
Capítulo IV: Metodología	21
4.1 Reactivos y materiales	22
4.2 Instrumentación	22
4.3 Análisis del comportamiento electroquímico de especies sensibles al pH en solución	23
4.4 Plataforma voltamperométrica de pH	24
4.4.1 Preparación del electrodo de carbón vítreo.....	24
4.4.2 Construcción de la plataforma voltamperométrica de pH.....	24

4.4.3 Optimización de la respuesta de la plataforma voltamperométrica de pH.....	25
4.4.4 Caracterización de la plataforma voltamperométrica de pH	26
4.4.5 Aplicación de la plataforma voltamperométrica de pH	26
4.5 Biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos.....	26
4.5.1 Construcción del biosensor monoenzimático de triglicéridos	26
4.5.2 Optimización del biosensor monoenzimático de triglicéridos.....	27
4.5.3 Caracterización del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos.....	28
4.5.4 Aplicación del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos.....	28
4.6 Biosensor voltamperométrico monoenzimático de glucosa.....	28
Resultados	30
Capítulo V: Análisis del comportamiento electroquímico de especies sensibles al pH en solución.....	31
5.1 Comportamiento electroquímico del Rojo de alizarina S en solución	32
5.2 Comportamiento electroquímico de la dopamina en solución.....	37
5.2.1 Comportamiento electroquímico de la dopamina en solución sin desoxigenación	38
5.2.2 Comportamiento electroquímico de la dopamina en solución con desoxigenación	42
5.3 Mecanismo integral de electropolimerización de la dopamina.....	49
Capítulo VI: Plataforma voltamperométrica de pH	55
6.1 Construcción de la plataforma voltamperométrica de pH	56
6.2 Plataforma voltamperométrica de pH con Nafion.....	58
6.3 Optimización de la plataforma voltamperométrica de pH	59
6.4 Caracterización de la plataforma voltamperométrica de pH.....	63
6.4.1 Caracterización electroquímica de la plataforma voltamperométrica de pH.....	63
6.4.2 Caracterización de la plataforma voltamperométrica de pH por microscopia.....	70
6.4.3 Caracterización de la plataforma voltamperométrica de pH por espectroscopia de infrarrojo.	77

6.5 Aplicación de la plataforma voltamperométrica de pH	79
Capítulo VII: Biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos	81
7.1 Funcionamiento del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos.....	82
7.2 Acercamiento al desarrollo del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos.....	83
7.3 Optimización del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos.....	85
7.4 Caracterización del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos.....	88
7.4.1 Caracterización del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos por espectroscopia de impedancia electroquímica.....	88
7.4.2 Caracterización del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos por Microcopia electrónica de barrido	89
7.5 Aplicación del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos.....	91
Capítulo VIII: Biosensor voltamperométrico monoenzimático de glucosa	94
8.1 Funcionamiento del biosensor voltamperométrico monoenzimático de glucosa.....	95
8.2 Desarrollo del biosensor voltamperométrico monoenzimático de glucosa	96
Capítulo IX: Conclusiones	100
Capítulo X: Perspectivas.....	102
Capítulo XI: Referencias	104
Capítulo XII: Anexos	115
9.1 Anexo 1: Valores de pKa de las especies involucradas en la oxidación de la H ₃ DA ⁺	116
9.2 Anexo 2: Optimización de la plataforma voltamperométrica	116
9.3 Anexo 3: Cálculos para la cuantificación de triglicéridos.....	120

Abreviaturas

- GCE: Electrodo de carbón vítreo
- CV: Voltamperometría cíclica
- DPV: Voltamperometría diferencial de pulso
- EC: Número de la comisión de enzimas
- RSD%: Desviación estándar relativa en porcentaje
- H₂ARS: Rojo de alizarina S
- H₃DA⁺: Dopamina
- HDAQ⁺: Dopaminoquinona
- H₃LDAC⁺: Leucodopaminocromo
- HDAC⁺: Dopaminocromo
- H₃DHI⁺: 5,6-dihidroxiindol
- HIQ⁺: 5,6-indolquinona
- SCE: Electrodo de referencia de calomel saturado
- TB: Tributirina
- EDS: Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva

Índice de figuras

Figura 1: Estructura química de las especies sensibles al pH estudiadas. a) Rojo de alizarina S (H_2ARS). b) Dopamina (H_3DA^+).	23
Figura 2: Construcción de la plataforma voltamperométrica de pH.	25
Figura 3: Construcción del biosensor monoenzimático de triglicéridos.	27
Figura 4: Estructura química de la tributirina.	27
Figura 5: Construcción del biosensor monoenzimático de glucosa.	29
Figura 6: Estructura química de la glucosa.	29
Figura 7: Voltamperogramas cíclicos del rojo de alizarina S (H_2ARS) 1 mM en buffer Britton-Robinson 0.05 M a diferentes valores de pH, velocidad de barrido: 100 mV/s, step: 0.01 V.	33
Figura 8: Reacciones de óxido-reducción del rojo de alizarina (H_2ARS).	35
Figura 9: Voltamperogramas cíclicos del rojo de alizarina S a partir de potencial de corriente nula en buffer Britton-Robinson 0.05 M pH 3 (azul: primer ciclo, rojo: segundo ciclo). a) En sentido catódico. b) En sentido anódico.	35
Figura 10: a) Curva de calibración potencial contra pH a partir de la señal de oxidación I del rojo de alizarina (H_2ARS). b) Diagrama tipo Pourbaix para el par TTS/ H_2ARS .	36
Figura 11: Diagrama de distribución de especies de la dopamina (H_3DA^+).	38
Figura 12: Voltamperogramas cíclicos de la dopamina (H_3DA^+) 1mM en buffer Britton-Robinson 0.05 M a diferentes valores de pH, velocidad de barrido: 100 mV/s, step: 0.01 V, sin desoxigenación.	40
Figura 13: Reacciones involucradas en la oxidación de la dopamina (H_3DA^+).	42
Figura 14: Voltamperogramas cíclicos de la dopamina (H_3DA^+) 1mM en buffer Britton-Robinson 0.05 M a diferentes valores de pH, velocidad de barrido: 100 mV/s, step: 0.01 V, en condiciones desoxigenadas.	43
Figura 15: Curva de potencial contra pH para la señal de oxidación de la dopamina (H_3DA^+). a) Sistema sin desoxigenar. b) Sistema desoxigenado.	46
Figura 16: Diagramas tipo Pourbaix E° contra pH. a) Par $HDAQ^+/H_3DA^+$. b) Par $HDAC^+/H_3LDAC^+$. c) Par HIQ^+/H_3DHI^+ . d) Los diagramas combinados.	47
Figura 17: Voltamperogramas cíclicos de la dopamina (H_3DA^+) en solución sin protección de la luz. a) A pH 6. b) A pH 11.	48
Figura 18: Mecanismo integral propuesto de la electropolimerización de la dopamina (H_3DA^+).	50
Figura 19: Identidad ácido base de las especies involucradas en la electropolimerización de la dopamina (H_3DA^+).	51
Figura 20: Propuesta de la formación de la polidopamina mediante un mecanismo de radicales libres a partir de la 5,6-indolquinona. Elaboración propia.	52
Figura 21: Propuesta de las posibles estructuras de la polidopamina obtenida por electropolimerización. a) Lineal. b) Mixta. c) Ramificada.	53
Figura 22: Voltamperogramas cíclicos de la electropolimerización de la dopamina en buffer de fosfatos (PBS) 0.1M pH 7, 5 ciclos, 50 mV/s. a) En condiciones con oxígeno. b) En condiciones desoxigenadas.	54
Figura 23: Plataforma voltamperométrica de pH sin Nafion. a) Electropolimerización de la dopamina (H_3DA^+) sobre la superficie de carbón vítreo. b) Voltamperogramas cíclicos de la polidopamina. c) Curva de calibración	

	potencial contra pH a partir de los potenciales de oxidación de la polidopamina.	56
Figura 24:	Plataforma voltamperométrica de polidopamina con Nafion. a) Electropolimerización de la dopamina sobre la superficie de carbón vítreo con Nafion. b) Voltamperogramas diferenciales de pulso de la polidopamina. c) Curva de calibrado potencial contra pH.	58
Figura 25:	Efectos principales para medias del diseño Taguchi L ₉ (3 ³) para la optimización de la plataforma voltamperométrica de pH.	60
Figura 26:	Comportamiento electroquímico de la polidopamina. a) Voltamperogramas diferenciales de pulso de la polidopamina a diferentes pH. b) Curva de calibración potencial contra pH para la polidopamina.	60
Figura 27:	Comportamiento electroquímico de la polidopamina. a) Voltamperogramas diferenciales de pulso de la polidopamina a diferentes pH. b) Curva de calibración potencial contra pH para la polidopamina.	61
Figura 28:	Plataforma voltamperométrica de pH de polidopamina con Nafion en las condiciones óptimas. a) Electropolimerización de la dopamina sobre la superficie de carbón vítreo con Nafion en condiciones optimizadas. b) Voltamperogramas diferenciales de pulso de la polidopamina a diferentes valores de pH. c) Curva de calibración potencial contra pH a partir de los potenciales de oxidación de la polidopamina.	62
Figura 29:	Señales electroquímicas de la polidopamina. a) Por voltamperométrica cíclica. b) Por voltamperométrica diferencial de pulso.	64
Figura 30:	Voltamperogramas diferenciales de pulso de las señales de la polidopamina y su respectiva curva de potencial contra pH (se muestra únicamente los picos máximos de las señales para mejor claridad). A) Voltamperogramas diferenciales de pulso de la señal A. b) Curva de calibración potencial contra pH a partir de los potenciales de la señal A. c) Voltamperogramas diferenciales de pulso de la señal B. d) Curva de calibración potencial contra pH a partir de los potenciales de la señal B. e) Voltamperogramas diferenciales de pulso de la señal C. f). Curva de calibración potencial contra pH a partir de los potenciales de la señal C.	65
Figura 31:	Identificación de señales por voltamperometría cíclica (CV) (azul: primer ciclo; naranja: segundo ciclo) y diferencial de pulsos (DPV). a) Después de oxidación. b) Después de reducción.	66
Figura 32:	Reacciones de óxido-reducción de la polidopamina.	67
Figura 33:	Estabilidad del potencial de la plataforma voltamperométrica de pH.	68
Figura 34:	Curva de calibración potencial contra pH a partir del potencial de corriente nula de la plataforma voltamperométrica.	69
Figura 35:	Impedancia electroquímica: Diagrama de Nyquist para la plataforma voltamperométrica, en el intervalo de frecuencias de 1 MHz a 1 KHz en solución 5 mM de K ₄ [Fe(CN) ₆], 5 mM de K ₃ [Fe(CN) ₆] y 0.05 M de KCl.	70
Figura 36:	Caracterización óptica de la plataforma voltamperométrica. a) Mediante cámara de un celular convencional. b) Por microscopía óptica de 50x. c) Por microscopía óptica de 400x.	71
Figura 37:	Fotografías de los electrodos modificados para Microscopia Electrónica de Barrido (SEM). a) Electrodos modificados. b) Electrodos modificados recubiertos de oro.	73

Figura 38: Caracterización del electrodo de carbón vítreo de la plataforma voltamperométrica de pH por Microcopia electrónica de barrido (SEM). a) A 45x. b) A 10000x. c) Espectro de EDS.	73
Figura 39: Caracterización de la membrana de Nafion sobre el electrodo de carbón vítreo de plataforma voltamperométrica de pH por Microcopia electrónica de barrido (SEM). a) A 45x. b) A 10000x. c) Espectro de EDS.	74
Figura 40: Caracterización de la plataforma voltamperométrica de pH por Microcopia electrónica de barrido (SEM). Electrodo modificado con polidopamina y la membrana de Nafion. a) A 45x. b) A 10000x. c) Espectro de EDS.	75
Figura 41: Mapeo de elementos del electrodo de carbón vítreo por EDS	75
Figura 42: Mapeo de elementos del electrodo de carbón vítreo modificado con Nafion por EDS.	76
Figura 43: Mapeo de elementos del electrodo de carbón vítreo modificado con Nafion y polidopamina por EDS.	76
Figura 44: Fotografías de las membranas para el análisis de IR. a) Membrana de Nafion. b) Membrana de Nafion con polidopamina en su forma reducida. c) Membrana de Nafion con polidopamina en su forma oxidada.	77
Figura 45: Espectros de IR. a) Dopamina. b) Membrana de Nafion. c) Polidopamina en su forma reducida. d) Polidopamina en su forma oxidada.	78
Figura 46: Hidrólisis enzimática de triglicéridos.	82
Figura 47: Representación del funcionamiento del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos. a) Funcionamiento del biosensor. b) Desplazamiento de los potenciales de oxidación de la polidopamina hacia potenciales mayores con el aumento de la concentración de triglicéridos. c) Curva potencial contra concentración de triglicéridos.	83
Figura 48: Evaluación del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos con tributirina. a) Voltamperogramas diferenciales de pulso a diferentes concentraciones de tributirina. b) Curva de calibración potencial contra concentración de tributirina.	84
Figura 49: Evaluación del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos con tributirina en época de frío. a) Voltamperogramas diferenciales de pulso a diferentes concentraciones de tributirina. b) Curva de calibración potencial contra concentración de tributirina.	85
Figura 50: Gráfico de efectos principales para medias del diseño Taguchi para la optimización integral del biosensor enzimático de triglicéridos.	86
Figura 51: Biosensor monoenzimático de triglicéridos en las condiciones óptimas. a) Voltamperogramas diferenciales de pulso. b) Curva de potencial contra concentración de tributirina.	87
Figura 52: Impedancia electroquímica: Diagrama de Nyquist para el biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos, en el intervalo de frecuencias de 1×10^6 a 1×10^3 Hz en solución 5 mM de $K_4[Fe(CN)_6]$, 5 mM de $K_3[Fe(CN)_6]$ y 0.05 M de KCl.	89
Figura 53: Caracterización del biosensor monoenzimático de triglicéridos por microscopia electrónica de Barrido (SEM). a) A 45x. b) A 10000x. c) Espectro de EDS.	90
Figura 54: Mapeo de elementos del biosensor enzimático de triglicéridos	91

Figura 55: Análisis del aceite de Canola. (a) Voltamperogramas diferenciales de pulso. (b) Curva de adición patrón potencial contra concentración de tributirina.	92
Figura 56: Reacciones involucradas en el funcionamiento del biosensor voltamperométrico monoenzimático de glucosa. a) Reacción enzimática de la glucosa oxidasa. b) Hidrólisis de D-gluconolactona. c) Reacción general.	95
Figura 57: Representación del funcionamiento del biosensor voltamperométrico monoenzimático de glucosa. a) Funcionamiento del biosensor. b) Desplazamiento de los potenciales de la señal A de la polidopamina hacia potenciales mayores con el aumento de la concentración de glucosa. c) Curva de potencial contra concentración de glucosa.	96
Figura 58: Biosensor monoenzimático de glucosa. a) Voltamperogramas diferenciales de pulso del biosensor. b) Curva de potencial contra concentración de glucosa.	97

Índice de tablas

Tabla 1: Sensores voltamperométricos de pH.	17
Tabla 2: Diseño de experimentos Taguchi L₉ (3³) para la optimización de la plataforma voltamperométrica de pH.	25
Tabla 3: Diseño de experimentos Taguchi L₉ (3⁴) para la optimización integral del biosensor monoenzimático de triglicéridos.	28
Tabla 4: Sensibilidad de las señales de óxido-reducción del rojo de alizarina S (H₂ARS).	37
Tabla 5: Sensibilidad de las señales de óxido-reducción de la dopamina (H₃DA⁺).	45
Tabla 6: Potenciales normales (V) de los pares involucrados en la oxidación de la dopamina (H₃DA⁺) (vs Ag/AgCl) obtenidos a partir de los voltamperogramas cíclicos de la dopamina (H₃DA⁺).	46
Tabla 7: Resultados del diseño de experimentos Taguchi L₉ (3³) para optimización de la plataforma voltamperométrica de pH.	59
Tabla 8: Parámetros analíticos de la plataforma voltamperométrica de pH.	62
Tabla 9: Análisis de pH de muestras comerciales.	79
Tabla 10: Resultados del diseño de experimentos Taguchi L₉ (3⁴) de la optimización del biosensor monoenzimático de triglicéridos.	86
Tabla 11: Parámetros analíticos del biosensor monoenzimático de triglicéridos.	88
Tabla 12: Biosensores electroquímicos para la cuantificación de triglicéridos basados en un cambio de pH.	88
Tabla 13: Concentración de triglicéridos en aceites comerciales.	92

**Plataformas
voltamperométricas de pH
para el desarrollo de
sensores electroquímicos**

Capítulo I: Introducción

En la actualidad existe la creciente necesidad de contar con nuevas metodologías analíticas, que sean simples, robustas, económicas y fáciles de implementar, que sirvan como alternativas para la cuantificación de diversas especies de interés. Para cumplir con esta tarea los sensores y biosensores electroquímicos surgen como una atractiva alternativa, que requiere tiempos cortos de análisis.

Para el diseño y funcionamiento de algunos de los sensores y biosensores electroquímicos que se han desarrollado a lo largo de los años, el cambio de pH se ha empleado como principio de transducción. En este caso, dicho cambio se asocia a una reacción o evento de reconocimiento en el cual la especie de interés o analito está relacionado con un equilibrio ácido-base.

Por otro lado, el pH se ha convertido en uno de los parámetros químicos más importantes en cualquier entorno químico, razón por la cual se han desarrollado diversas metodologías para su medición. En los últimos años los sensores voltamperométricos de pH han surgido como una alternativa ya que no requieren calibración, son asequibles, fáciles de construir y tienen un buen desempeño en la medición de este parámetro.

En el presente trabajo se presenta el diseño de una plataforma voltamperométrica de pH, basada en un electrodo de carbón vítreo con Nafion y polidopamina, como plataforma para el desarrollo de nuevos sensores electroquímicos para la cuantificación de triglicéridos y glucosa.

Capítulo II: Antecedentes

Para llevar a cabo la cuantificación de diversas especies de interés se cuenta con gran variedad de métodos analíticos como los cromatográficos, ópticos y espectroscópicos; los cuales son de elevado costo, requieren de personal capacitado para su manejo y de un largo tiempo de análisis. Entre estos, los sensores electroquímicos destacan como una alternativa por su simplicidad, bajo costo y requerir tiempos cortos de análisis (Baranwal et al. 2022; Vivaldi et al. 2021; Kimmel et al. 2012).

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) define a un sensor químico como “un dispositivo que convierte datos químicos, que van desde la concentración de un solo componente de la muestra hasta el análisis completo de la composición, en una señal utilizable analíticamente”. Un sensor está constituido principalmente por dos partes esenciales: un receptor y un transductor. El receptor interactúa con el analito y convierte al evento de reconocimiento en una señal de salida, mientras que el transductor convierte la señal creada por el receptor en un valor útil. Si el receptor es de origen biológico (por ejemplo, enzimas) el dispositivo se denomina como biosensor (Baranwal et al. 2022).

Un sensor electroquímico es un dispositivo que detecta cuantitativamente una especie química a partir de sus propiedades electroquímicas (óxido-reducción), donde la información analítica es proveída por una señal eléctrica producida por la interacción de la especie de interés con la de reconocimiento (Miyake 2003; Baranwal et al. 2022).

Uno de los analitos de mayor interés es el pH ya que controla las características y comportamiento de sustancias químicas, la solubilidad de muchas moléculas y biomoléculas, la actividad enzimática y los equilibrios químicos en organismos vivos (Yuqing et al. 2005; Khan et al. 2017; Ghoneim et al. 2019; Vivaldi et al. 2020).

Debido a lo anteriormente planteado, en este capítulo se hablará acerca del concepto del pH y los sensores químicos reportados para su medición, haciendo énfasis en los electroquímicos y de estos, particularmente en los voltamperométricos; así como del uso de sensores electroquímicos de pH en general como transductores para el desarrollo de biosensores electroquímicos.

2.1. pH

El pH fue definido por primera vez en 1909 por el bioquímico danés Soren Peer Lauritz Sorensen, quien lo describió como el logaritmo negativo de la concentración del ion hidrógeno (molL^{-1}) (Ec. 1) (Avolio et al. 2022; Chang y Goldsby 2013; Ghoneim et al. 2019; De Levie 2014).

$$pH = -\log_{10}[H^+] \quad \text{Ecuación 1}$$

Sin embargo, después de un siglo, se ha redefinido en términos de la actividad del ion H^+ , tal como la IUPAC recomienda, como el logaritmo negativo de la actividad del ion H^+ (Ec. 2)

(Avolio et al. 2022; Chang y Goldsby 2013; Ghoneim et al. 2019; De Levie 2014; Yuqing et al. 2005; Korostynska et al. 2007).

$$pH = -\log_{10}(\alpha_{H^+}) \quad \text{Ecuación 2}$$

El pH es uno de los parámetros más importantes en cualquier entorno químico. En el caso de reacciones que involucran H^+ , los mecanismos, la cinética y la termodinámica están afectados por el pH. Incluso en reacciones donde el pH no está directamente relacionado, este puede afectar las propiedades del catalizador o de las sustancias que reaccionan (Michalak et al. 2015) y es útil para controlar, optimizar y prevenir reacciones (Yuqing et al. 2005). Por otra parte, es útil para el diagnóstico de diversas enfermedades y el manejo de algunas patologías. El pH en sangre se puede usar para detectar el fallo de órganos y como un indicador en pacientes que sufren desórdenes ácido-base. En saliva y orina se asocia con la placa dentobacteriana, la salud bucal, infecciones, fatiga renal y síndrome metabólico (Vivaldi et al. 2020). Además, también afecta los procesos medioambientales y biológicos: la disponibilidad de nutrientes en el suelo, la especiación y absorción de contaminantes como los metales pesados, la aparición y distribución de organismos vivos, la tasa de calcificación de los microorganismos que dependen de carbonato de calcio en los océanos, la expresión genética en especies microbianas y los bioprocesos enzimáticos y metabólicos (Vivaldi et al. 2020; Avolio et al. 2022).

Debido a esto la medición del pH es una de las prácticas más comunes y cruciales en los diferentes campos científicos, industriales y académicos (Pöller y Schuhmann 2014; Galdino et al. 2015). Es aplicada en agricultura, medicina, bioquímica, bioprocesos, en la evaluación de la calidad del agua, en el tratamiento de aguas residuales, monitoreo ambiental, contaminación, química ambiental, en la industria alimentaria, farmacéutica, papel, plásticos, semiconductores, nuclear, cemento, vidrio y textil (Yuqing et al. 2005; Lu y Compton, 2014a; Galdino et al. 2015; Dai et al. 2015; Khan et al. 2017; Tham et al. 2019; Vivaldi et al. 2020).

2.1.1. Medición de pH

En la actualidad existen diferentes metodologías para la medición del pH, se cuenta con reactivos indicadores, tiras de pH, sensores ópticos, sensores másicos y sensores electroquímicos, todos estos se describen en la sección 2.2 (Yuqing et al. 2005; Korostynska et al. 2007; Kimmel et al. 2012; Khan et al. 2017; Vivaldi et al. 2020). De entre todas estas alternativas para la medición de pH, el electrodo de pH de vidrio es el más utilizado alrededor del mundo, debido a su alta sensibilidad y selectividad, disponibilidad comercial, bajo costo y respuesta rápida; sin embargo, presenta ciertos inconvenientes, como que su membrana es frágil y puede degradarse con el tiempo por lo que requiere un manejo cuidadoso, lo que complica su uso *in situ*. El dispositivo convencional está compuesto por dos electrodos con soluciones de llenado internas acuosas que dificultan su miniaturización y su uso en posiciones que no sean verticales. Las soluciones mal amortiguadas o con baja concentración

de electrolitos sufren un largo tiempo de respuesta durante las mediciones de pH. Más importante aún, puede sufrir “errores alcalinos”, inestabilidad y deriva o fluctuación de la señal. Debido a estos problemas requiere de una calibración constante y que la membrana de vidrio se almacene en solución, lo que produce que estos electrodos sean poco prácticos para el análisis en campo (Lu y Compton 2014a; Tham et al. 2019; Rabboh y O’Neil 2020).

2.2. Sensores de pH

El primer sensor de pH fue desarrollado por Biilmann en 1921, el cual dependía de la pareja redox quinona/hidroquinona para medir el pH en un intervalo de 1-8 con algunas complicaciones: se limitaba a mediciones exactas del pH de no más de 8, presentaba error salino a fuerzas iónicas 1-2 M y producía una incertidumbre de 0.1 unidades de pH; además, requería la ausencia de agentes oxidantes o reductores que pudieran interferir con la fiabilidad (Galster 1991; Tham et al. 2019).

El electrodo de Biilmann era el instrumento más utilizado para la determinación electroquímica del pH en el laboratorio hasta la introducción del electrodo de vidrio, el cual se ha convertido en el sensor más importante para el análisis del pH (Galster 1991).

El desarrollo del electrodo de vidrio comenzó en 1875, cuando Thomson se percató que el vidrio es un electrolito sólido a través del cual los iones metálicos alcalinos pueden conducir corriente. Esto permitió a Max Cremer proponer que el vidrio podría servir como una barrera semipermeable para cationes univalentes, y por primera vez, en 1906, empleó la membrana de vidrio para hacer determinaciones electroquímicas. El electrodo de Cremer tenía una respuesta de 46-50 mV/pH para iones hidrógeno. Tres años más tarde, en 1909, Haber y Klemensiewicz entendieron la importancia de la ecuación de Nernst y emplearon el electrodo de vidrio para el seguimiento de curvas de valoración y otros propósitos; también se dieron cuenta de la importancia de la hidratación de la membrana. Finalmente, los electrodos de vidrio completos se volvieron comercialmente disponibles hasta la década de 1930 (Galster 1991).

A continuación, se describen algunos de los sensores que se han desarrollado para la medición del pH.

2.2.1 Indicadores de pH

Los métodos colorimétricos para determinar el pH fueron muy importantes en la época anterior al electrodo de vidrio. Los reactivos indicadores de pH son ácidos orgánicos cuyo cambio de color es el resultado de un rearrreglo de la molécula debido a un cambio en el pH. Se usan en soluciones acuosas o alcohólicas, en concentraciones 0.01 a 0.05%, donde solo unas pocas gotas se añaden a la solución problema. Los indicadores universales se han empleado para estimar el valor de pH de manera rápida, en un intervalo de aproximadamente de 10 unidades de pH. Para esta tarea se requieren de un mínimo de cinco indicadores como azul de timol, amarillo de dimetilo, rojo de metilo, azul de bromotimol y fenolftaleína, los cuales sirven para detectar el pH en un intervalo de 1 a 11. Sin embargo, no es fácil distinguir

la diversidad de colores de una medición, lo que puede acarrear errores significativos (Korostynska et al. 2007; Galster 1991).

2.2.2 Tiras de pH

Las tiras de pH son tiras de papel u otro material con indicadores, que en contacto con una solución a un determinado pH muestran un color particular correspondiente al pH de la solución. El pH se mide comparando el color obtenido con la escala de color proporcionada por el fabricante. A pesar de ser un método simple, rápido, portable y que puede trabajar en un amplio intervalo de pH, no es posible medir el valor del pH con precisión; de hecho, se espera un error de 0.5 unidades de pH, y en ocasiones se tienen errores mayores debido al escaso contraste entre los colores, una alta concentración de sales, la temperatura y la presencia de sustancias orgánicas. Los indicadores pueden ser impregnados o inmovilizados químicamente en papel o plástico para evitar su rápida disolución, por lo que generalmente son unidos covalentemente a la celulosa o copolimerizados con acrilamida o metacrilamida (Yuqing et al. 2005; Khan et al. 2017; Galster 1991).

Si bien los indicadores de pH y las tiras de pH son dispositivos que transforman el pH en una señal (cambio de color) que puede usarse, son como tal el receptor de un sensor, en el cual el traductor es el propio observador pues detecta el cambio de color y decide con base en este. Considerando el error en la medición del pH que presentan estos dispositivos, existe la posibilidad de tomar una decisión incorrecta, ya que la solución podría tener un pH diferente al que marca el dispositivo.

2.2.3 Sensores ópticos de pH

Se basan en especies ácido-base con un pK_a específico, con un coeficiente de absorptividad elevado y con absorción y emisión en el espectro visible. El indicador se inmoviliza en una superficie transparente a la radiación producida por una fuente. Esta radiación se hace pasar a través de una fibra conductora de luz hasta llegar al indicador, el cual absorbe e irradia luz a la segunda fibra que lleva la señal hasta el detector. La fibra óptica es flexible y puede modificarse fácilmente. El intervalo de pH en el que trabajan los sensores ópticos se ubica entre 0 y 10.5. Este tipo de sensores presentan una respuesta rápida, bajo costo, capacidad para medir continuamente, no requieren condiciones especiales de almacenamiento y pueden detectar variaciones de pH de hasta 0.01 unidades. Sin embargo, tienen poca estabilidad a largo plazo, debido a la degradación del indicador y dependen significativamente de la temperatura (Khan et al. 2017; Galster 1991; Kimmel et al. 2012; Vivaldi et al. 2021).

2.2.4 Sensores másicos de pH

Los sensores másicos de pH se basan en un cambio reversible de masa, el cual puede detectarse mediante la frecuencia de resonancia o una deformación en la superficie del sensor. Entre los sensores másicos para la medición del pH se encuentran los *cantiléver* y los magnetoelásticos. Los *cantilévers* se basan en materiales con propiedades piezo-resistivas que se unen al cantiléver. El pH se detecta por la deformación del *cantiléver* (expansión o contracción) que se produce por el cambio de pH. Poseen una elevada sensibilidad, bajo

costo, respuesta rápida y requieren de poco volumen de muestra, sin embargo, la deformación puede ser de nanómetros, por lo que se requiere de un equipo especializado para su detección.

Los sensores magnetoelásticos se basan en la interconversión de energía magnética y elástica. Un campo eléctrico se aplica a una bobina, la cual induce un campo magnético que, a su vez, hace vibrar un material sensible al pH a una determinada frecuencia. Así, el cambio de pH produce un cambio de masa en el material sensible al pH, lo cual produce un cambio en la frecuencia de vibración del material que se detecta en una bobina captadora. De esta manera, el cambio de pH se detecta al relacionarlo con la frecuencia de vibración. Si la masa aumenta la frecuencia disminuye y viceversa. Es un método relativamente económico pero la frecuencia de vibración puede verse afectada por la temperatura, lo que afecta su fiabilidad (Khan et al. 2017).

Bashir y colaboradores desarrollaron un microsensor másico de pH de tipo cantiléver. El sensor está formado por un microcantiléver de silicio modificado con un hidrogel copolimerizado a partir de poli(ácido metacrílico) y dimetacrilato de poli(etilenglicol). El cantiléver se sujeta en uno de sus extremos, a una determinada altura, a una base de silicio, de tal forma que el otro extremo se encuentra libre a una determinada altura respecto de la base. Entonces, el cambio de pH produce una deformación del hidrogel, de tal manera que el extremo libre se aproxima a la base de silicio. Para medir el pH se relaciona la distancia que se ha desviado el extremo libre del cantiléver, respecto de su posición inicial. El dispositivo posee un intervalo lineal de pH de 5.9 a 6.5 con una sensibilidad de 18.3 $\mu\text{m}/\text{pH}$. La desviación del cantiléver se midió con un microscopio óptico (Bashir et al. 2002).

Ruan y colaboradores desarrollaron un sensor másico de pH tipo magnetoelástico. El sensor está formado por una placa magneto-elástica, con una composición $\text{Fe}_{40}\text{Ni}_{40}\text{P}_{14}\text{B}_6$, en la cual se coloca un hidrogel de poli(ácido acrílico co-isooctil acrilato). El sensor se coloca dentro de una solución, contenida en un recipiente, entre dos bobinas. Con el aumento del pH la frecuencia disminuye, pues el hidrogel incrementa su masa y se expande. Entonces, para medir el pH, este se relaciona con la frecuencia, producida por un cambio de masa, a menor pH mayor frecuencia. El sensor posee un intervalo de trabajo de 4.4 a 8.5 de pH con una sensibilidad de 506 Hz/pH (Ruan et al. 2003).

En el caso de los trabajos de Bashir y colaboradores y Ruan y colaboradores, el aumento de la masa y la expansión del hidrogel se debe a que el hidrogel presenta grupos ácidos, que con el aumento del pH se desprotonan y generan un incremento en el número de cargas, en la repulsión electrostática entre las cadenas y en la hidrofiliidad de la red, lo que origina un aumento en el contenido de contraiones dentro del hidrogel. Mientras que la disminución del pH provoca el caso contrario, que disminuya el contenido de contraiones, aumente la hidrofobicidad y se contraiga el hidrogel (Buenger et al. 2012).

2.2.5 Sensores electroquímicos de pH

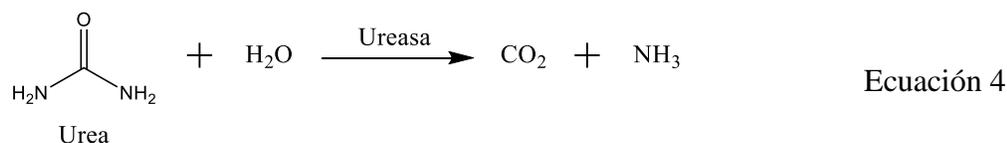
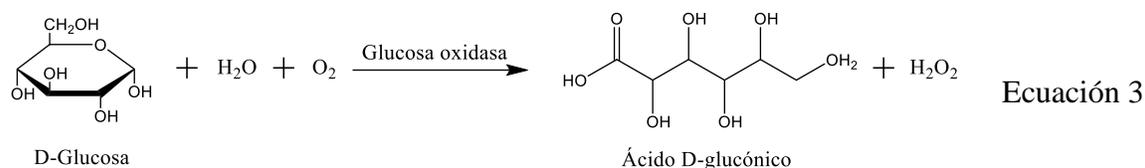
Los sensores electroquímicos poseen un gran número de ventajas, tales como alta sensibilidad y precisión, buena reproducibilidad, amplios intervalos de pH de trabajo, buena estabilidad, fiabilidad a largo plazo, respuesta rápida, simplicidad, bajo costo, selectividad, facilidad para miniaturizarse y facilidad de construcción (Vivaldi et al. 2021; Kimmel et al. 2012; Baranwal et al. 2022). Estos sensores se describen con mayor profundidad en la sección 2.3

2.2.6 Sensores de pH como transductores

El electrodo de pH de vidrio se ha empleado como transductor para la cuantificación de glucosa, urea, dióxido de carbono y amoníaco. En el caso de los gases como dióxido de carbono y amoníaco, los sensores están basados en una membrana permeable a gases y una solución electrolítica en contacto con el electrodo de vidrio. Así, la solución se encuentra contenida entre la membrana permeable a gases y la membrana de vidrio, donde el electrodo de vidrio detecta el cambio de pH debido a que el gas participa en un equilibrio ácido-base donde la solución electrolítica está compuesta por NaHCO_3 para el sensor de dióxido de carbono y de NH_4Cl para el sensor de amoníaco (Pisoschi 2016; Meyerhoff et al. 1982).

En este mismo sentido, el electrodo de vidrio se ha usado como transductor en biosensores. Estos se construyen basados en la combinación de un elemento de bioreconocimiento (generalmente una enzima) y un transductor, que detecta la variación de protones u otros iones, donde la señal está correlacionada con la concentración del analito. El transductor más simple desarrollado para biosensores potenciométricos corresponde al electrodo de vidrio. En este caso, se inmoviliza una enzima en una membrana, que posteriormente se fija en el bulbo del electrodo de vidrio. La respuesta se obtiene de la reacción biocatalítica de la enzima.

En el biosensor para determinar glucosa, la enzima glucosa oxidasa se inmoviliza en una membrana de celofán, nailon o nitrocelulosa que se fija al bulbo del electrodo de vidrio; entonces, el electrodo mide la disminución de pH resultado de la reacción enzimática de la glucosa oxidasa que transforma la glucosa a ácido glucónico (Ec. 3) (Meyerhoff et al. 1982). En otro biosensor de glucosa se ha inmovilizado la glucosa oxidasa en nanopartículas de ferrita de hierro (Fe_3O_4)/quitosano sobre un electrodo de vidrio modificado con oro (Khun et al. 2012). Siguiendo este diseño, el electrodo de vidrio también se ha utilizado como transductor para la cuantificación de urea, donde la ureasa, que cataliza la hidrólisis de urea (Ec. 4), esta inmovilizada en una membrana de PVC carboxilado, y el electrodo de vidrio detecta el aumento en el valor de pH resultado de la reacción enzimática (Koncki et al. 1994).



Seki y colaboradores desarrollaron biosensores potenciométricos para la cuantificación de urea, penicilina y glucosa, los cuales trabajan bajo el principio de un cambio de pH. Los biosensores están basados en un sensor potenciométrico de pH construido con un electrodo de óxido de silicio modificado con las enzimas ureasa, penicilinasa y glucosa oxidasa respectivamente, inmovilizadas con glutaraldehído (Seki et al. (1998).

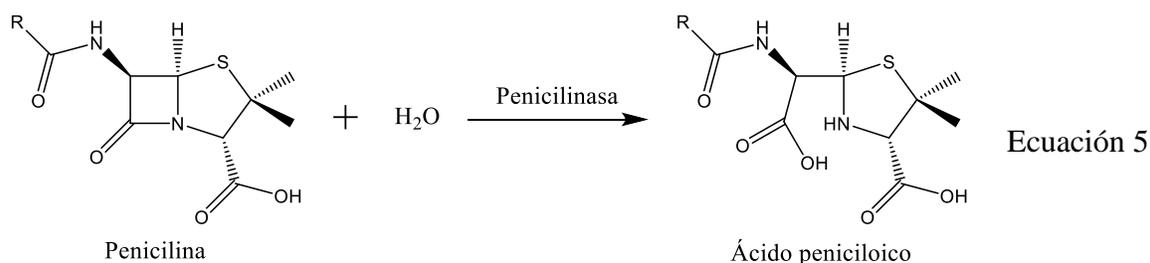
Karyakin y colaboradores desarrollaron un biosensor electroquímico para la cuantificación de glucosa, basado en un transductor potenciométrico de pH a partir de un electrodo de carbón vítreo modificado con polianilina, y glucosa oxidasa inmovilizada con una membrana de Nafion (Karyakin et al. 1999a). En el mismo grupo de trabajo también desarrollaron un biosensor electroquímico para la cuantificación de urea, basado en un traductor potenciométrico de pH a partir de un electrodo de carbón vítreo y electrodos serigrafados, modificados con polianilina y la enzima ureasa inmovilizada con una membrana de Nafion (Karyakin et al. 1999b).

Bardea y colaboradores construyeron biosensores electroquímicos para la cuantificación de éster etílico de N-acetil-4-tirosina y urea, empleando las enzimas α -quimotripsina y ureasa respectivamente. Ambos biosensores están basados en un transductor voltamperométrico de pH construido en un electrodo de oro modificado con pirroloquinolina quinona (PQQ) unida covalentemente a cistamina la cual está unida covalentemente al oro. En el primer biosensor la α -quimotripsina cataliza la hidrólisis del éster etílico de N-acetil-4-tirosina para formar el ácido correspondiente el cual disminuye el pH de la solución y produce un desplazamiento de la señal de oxidación de la pirroloquinolina quinona (PQQ), entonces la cuantificación se realiza relacionando el potencial con la concentración del éster etílico de N-acetil-4-tirosina. Mientras que, en el segundo biosensor, la ureasa hidroliza la urea a dióxido de carbono y amoniaco el cual aumenta el pH de la solución (Ec. 4) y para la cuantificación se relaciona el potencial con la concentración de urea (Bardea et al. 2000).

Stredanský y colaboradores desarrollaron biosensores para la cuantificación de urea, penicilina y oxalacetato basados en transductores amperométricos de pH modificados con las enzimas ureasa, penicilinasa y oxalacetato descarboxilasa, respectivamente. Estos

transductores están basados en especies redox: hemateína, lauril galato, poli(o-fenilendiamina) y azul de metileno y electrodos de platino, oro y grafito. Entonces, estas enzimas catalizan la hidrólisis de su respectivo sustrato, el cual se transforma en un ácido que disminuye el pH y la especie redox presente en el transductor permite monitorear este cambio pH al relacionar la intensidad de corriente con el pH, al imponer un determinado potencial que produce la oxidación o reducción de la especie redox. Estos biosensores se describen con mayor detalle a continuación (Stredanský et al. 2000).

Stredanský y colaboradores y Pizzariello y colaboradores desarrollaron un biosensor para la cuantificación de penicilina basado en un electrodo de platino modificado con la enzima penicilinasas cubierta por una membrana de diálisis. La penicilinasas cataliza la hidrólisis de penicilina a ácido peniciloico el cual disminuye el pH de la solución (Ec. 5). Entonces el electrodo modificado se introduce en una solución de hematina 0.5mM con penicilina, la cual se cuantifica al relacionar el cambio de corriente producida por el cambio de pH, con la concentración de la penicilina al imponer un potencial de 0 V (vs SCE) sobre el electrodo modificado, iniciando el análisis en un pH de 8.0 (Stredanský et al. 2000; Pizzariello et al. 2001).



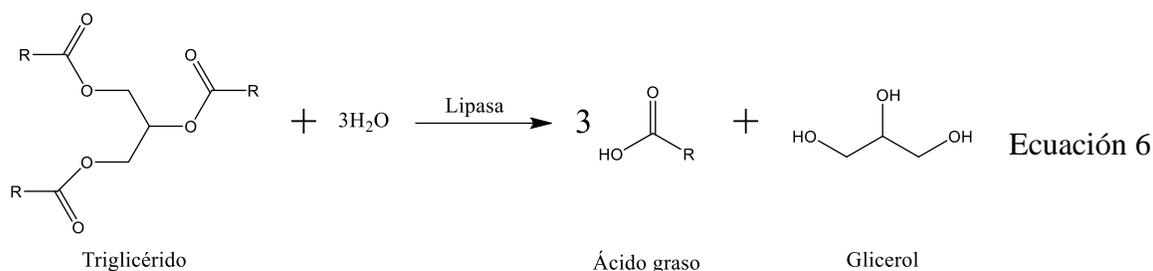
Stredanský y colaboradores construyeron dos biosensores amperométricos para la cuantificación de urea, uno basado en un electrodo composite de grafito modificado con lauril galato y la enzima ureasa, la cual cataliza la hidrólisis de urea a bicarbonato y ion amonio. La cuantificación se lleva a cabo relacionando el cambio de la corriente de la reacción de oxido-reducción del lauril galato producida por el cambio del pH, con la concentración de urea al imponer un potencial de 0.2 V (vs SCE), iniciando el análisis en un pH de 7.0. Otro basado en un electrodo de oro modificado con azul de metileno y ureasa cubierto con una membrana de diálisis, donde se relaciona el cambio de corriente con la concentración de urea, al imponer un potencial de -0.1 V (vs SCE), iniciando en un pH de 7.5 (Stredanský et al. 2000).

Vostiar y colaboradores diseñaron un biosensor amperométrico para la cuantificación de urea, basado en un sensor amperométrico de pH, a partir de un electrodo de carbón vítreo modificado con poli-azul de toluidina y al enzima ureasa. La enzima cataliza la hidrólisis de

urea, lo que da como resultado un aumento en el pH de la solución (Ec. 4). La cuantificación se debe a que se relaciona la intensidad de corriente con la concentración de urea, debido al cambio de pH producido por la acción enzimática, al imponer un potencial de -0.2 V (vs SCE) (Vostiar et al. 2002).

Zhang y colaboradores desarrollaron un biosensor amperométrico para la cuantificación de triglicéridos, basado en un electrodo de óxido de indio y estaño (ITO), modificado con nanopartículas de oro, polidopamina y la enzima lipasa. La cuantificación se lleva a cabo por CV bajo un principio de cambio de pH donde este cambio se detecta por un sensor amperométrico. El cambio de pH es producido por la hidrólisis enzimática de la tributirina que libera ácido butírico. La cuantificación de tributirina se realiza relacionando la corriente de oxidación de la polidopamina con la concentración de la tributirina. El dispositivo posee un intervalo de detección de 50-300 mgL⁻¹, un límite de detección de 0.84 mg L⁻¹ y una sensibilidad de 0.38 μA mg⁻¹ L⁻¹ cm⁻² (Zhang et al. 2014b).

Cruz Aburto desarrollo un biosensor monoenzimático para la cuantificación de triglicéridos basado en un transductor amperométrico de pH. El biosensor está conformado por un electrodo de carbón vítreo, modificado con una membrana de Nafion, poli-verde malaquita y la enzima lipasa, la cual hidroliza los triglicéridos a ácidos grasos y glicerol (Ec. 6). Entonces la cuantificación de los triglicéridos se logra relacionado el cambio de corriente, debido al cambio de pH, con la concentración de triglicéridos al imponer un potencial de +0.6 V (Cruz Aburto 2021).



También se ha reportado el diseño de biosensores potenciométricos para la cuantificación de creatinina empleando el principio de un cambio de pH, el cual se detecta por sensores potenciométricos de pH. El cambio de pH se debe a la generación de amoníaco producido en las reacciones enzimáticas que se describen a continuación. La creatinina iminohidrolasa y la creatinina deiminasa, hidrolizan a la creatinina para producir N-metilhidantoína y amoníaco. En otro diseño se emplean varias reacciones enzimáticas: la creatinina se hidroliza a creatina por acción de la creatinina amidohidrolasa, la creatina se hidroliza a sarcosina y urea por la reacción enzimática de la amidinohidrolasa, entonces la ureasa transforma a la urea en amoníaco y dióxido de carbono (Koncki 2007; Lad et al. 2008).

2.3. Sensores electroquímicos de pH

2.3.1. Sensores potenciométricos

Los sensores potenciométricos se basan en la medida del potencial a lo largo de una interfase, generalmente una membrana a corriente cero (Kimmel et al. 2012). Este tipo de sensores miden la diferencia de potencial entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo; en este caso el potencial del electrodo de trabajo depende de la concentración del analito en la solución (Khan et al. 2017). Desde la década de 1930 los sensores potenciométricos han sido los sensores más utilizados debido a su simplicidad y bajo costo (Baranwal et al. 2022). Estos sensores tienen una rápida respuesta y eficiencia, pueden ser usados casi universalmente y es uno de los métodos más sensibles para medir el pH de 0 hasta 14 con buena repetibilidad (Khan et al. 2017).

Lakard y colaboradores desarrollaron cinco sensores potenciométricos de pH, basados en electrodos de platino modificados con polipirrol, poliparafenilendiamina, polianilina, polietilenimina, polipropilenimina, con sensibilidades que van de los 34 a 52 mV/pH con buena linealidad en un intervalo de pH de 2 a 11 y elevada estabilidad en función del tiempo (Lakard et al. 2005).

Marxer y Schoenfisch diseñaron un sensor potenciométrico de pH, basado en una membrana sol-gel, con una sensibilidad de 55 mV/pH en un intervalo de pH de 3 a 8 (Marxer y Schoenfisch 2005).

Shim y colaboradores desarrollaron un sensor potenciométrico de pH, basado en un electrodo de oro modificado con óxido de rutenio nanoporoso, con una sensibilidad de 55.2 mV/pH (Shim et al. 2012).

Zuliani y colaboradores construyeron un sensor potenciométrico de pH serigrafiado, basado en un disco plano de carbón, con una sensibilidad de 51.9 ± 0.4 mV/pH en un intervalo de pH de 3 a 8 (Zuliani et al. (2014).

Kawahara y colaboradores desarrollaron un sensor potenciométrico de pH plano, flexible, desechable y robusto, basado en papel con grafito proveniente de lápices convencionales de grafito, donde el grafito se adhiere al papel frotándolo sobre el papel. El dispositivo posee una sensibilidad de entre 16.5-26.9 mV/pH en un intervalo de pH de 5 a 9 capaz de realizar tres mediciones simultáneas (Kawahara et al. 2018).

2.3.2 Sensores amperométricos

En este tipo de sensor el potencial se mantiene constante mientras se monitorea el cambio en la corriente; de esta manera la corriente es proporcional con la concentración del analito (Baranwal et al. 2022; Kimmel et al. 2012). En este sentido, se han desarrollado varios sensores amperométricos de pH. Gao y Song describieron un sensor amperométrico basado en un electrodo de grafito con polianilina como especie de reconocimiento para la medición

de pH de 1.81 a 9.91, donde las mediciones de corriente se realizaron a un potencial de +0.1 V. El sensor posee una sensibilidad de 30.9 mA/pH en el intervalo de 1.81 a 5.46 y de 13.2 mA/pH en el intervalo de 5.46 a 9.91. El dispositivo presentó una elevada selectividad, sensibilidad y estabilidad, buena precisión y un tiempo de medición corto (5-60 s) (Gao y Song 2009). Empleando la misma especie de reconocimiento, Sha y colaboradores reportaron un sensor amperométrico basado en un electrodo de carbón vítreo modificado con grafeno y polianilina para medir el pH en un intervalo de 1-11, al imponer un potencial de -0.1 V. El sensor presenta una sensibilidad de 50.14 μ A/pH en el intervalo de pH de 1 a 5, de 139.2 μ A/pH de 7 a 11 y un tiempo de respuesta corto (Sha et al. 2017).

Cruz Aburto y colaboradores desarrollaron un sensor amperométrico de pH basado en un electrodo de carbón vítreo, una membrana de Nafion y poli-verde malaquita para su uso en un intervalo de pH de 6.24 a 6.82 con una sensibilidad de 4 μ A/pH. El dispositivo funciona imponiendo un potencial de +0.6 V y detectando la corriente producida (Cruz Aburto et al. 2020).

2.3.3 Sensores voltamperométricos

Los sensores voltamperométricos obtienen información de uno o más analitos mediante la medición de la corriente en función del potencial (Kimmel et al. 2012). Estos sensores miden el pH en función de la medición del potencial de una pareja redox dependiente del pH (Amiri et al. 2016). Son una alternativa asequible, no requieren calibración, son de fácil construcción, presentan un excelente desempeño analítico comparado con el electrodo de vidrio, son fácilmente miniaturizables e incluso pueden ser desechables (Rabboh y O'Neil 2020; Galdino et al. 2015).

En los últimos años se ha desarrollado una gran variedad de sensores voltamperométricos de pH con electrodos de diversos materiales con diferentes elementos de reconocimiento. En la tabla 1 se recopilan algunos de los diferentes sensores voltamperométricos de pH reportados en la literatura.

Los sensores voltamperométricos de pH están basados en electrodos de alguna forma de carbón, principalmente carbón vítreo (Tham et al. 2019; Dai et al. 2015; Amiri et al. 2016; Lu y Compton 2014b), oro (Vivaldi et al. 2020; Pöller y Schuhmann 2014; Park y Kim 2013; Raj et al. 2002), platino (Rubinstein 1984; Aquino-Binag et al. 1996; Güngör et al. 2015) y diamante dopado con boro (Cobb et al. 2019; Lucio y Macpherson 2020).

En este tipo de sensores la medición del pH se realiza con diversas especies redox, como riboflavina (Tham et al. 2019), azul de toluidina (Pöller y Schuhmann 2014), ácido salicílico, salicilaldehído (Dai et al. 2015), quinonas (el grupo más usado) (Lu y Compton 2014a; Rabboh y O'Neil 2020; Lu y Compton 2014b; Park y Kim 2013; Cobb et al. 2019; Lucio y Macpherson 2020; Zhu et al. 2020), siringaldazina (Michalak et al. 2015; Güngör et al. 2015) y polianilina (Rubinstein 1984; Saikrithika y Kumar 2021), por mencionar algunos. Estos compuestos se han inmovilizado principalmente por absorción por goteo-evaporación (Tham

et al. 2019; Dai et al. 2015; Güngör et al. 2015; Saikrithika y Kumar 2021), *cross-linking* (Vivaldi et al. 2020; Pöller y Schuhmann 2014), deposición electroquímica (Pöller y Schuhmann 2014; Rubinstein 1984) y electropolimerización (Amiri et al. 2016; Aquino-Binag et al. 1996; Mandler et al. 1992). En la tabla 1 se resumen las diversas especies sensibles al pH, así como el método de inmovilización de algunos sensores voltamperométricos de pH.

Considerando las ideas anteriormente presentadas de que algunos biosensores se basan en el principio de un cambio de pH, donde este se detecta por medio de un sensor electroquímico, y de que los sensores voltamperométricos de pH se presentan como una novedosa alternativa para la medición del pH. En el presente trabajo se propone el desarrollo de una plataforma voltamperométrica de pH basada en un electrodo de carbón vitreo con Nafion y polidopamina para su uso en el diseño de biosensores voltamperométricos monoenzimáticos de triglicéridos y glucosa.

Para el desarrollo de la plataforma voltamperométrica de pH, como esta requiere de una especie redox que mida el pH, primero se analizará el compartimento electroquímico en solución del rojo de alizarina y la dopamina, lo que permitirá identificar la mejor especie redox para la construcción de la plataforma y obtener información sobre su electropolimerización. Posteriormente, una vez construida la plataforma, esta se modificará con las enzimas lipasa y glucosa oxidasa para la cuantificación de triglicéridos y glucosa, respectivamente.

Tabla 1: Sensores voltamperométricos de pH.

Material del electrodo	Elemento de reconocimiento	Método de inmovilización	Intervalo de pH	Sensibilidad	Referencia
Platino	Cloranil	Adsorción por inmersión	3.0-6.0	75.0 mV/pH	Rubinstein (1984)
Platino	Polianilina	Electrodeposición	3.0-8.0	115.0 mV/pH	Rubinstein (1984)
Carbón vítreo	Antraquinona-2,6-disulfonato	Electropolimerización	2.0-9.0	55.0 mV/pH	Mandler et al. (1992)
Platino	3-(2,5-dihidroxibenzil)polipirrol	Electropolimerización	3.0-10.0	46.0 mV/pH	Aquino-Binag et al. (1996)
Oro	4-mercapto-N-fenilquinonadiimina	Adsorción por inmersión y transformación electroquímica	6.1-10.3	56.0 mV/pH	Raj et al. (2002)
Grafito pirolítico	Antraquinona	Adsorción por inmersión	1.0-9.0	58.0 mV/pH	Wildgoose et al. (2003)
Grafito pirolítico	Antraceno	Adsorción mecánica	1.0-12.0	57.5 mV/pH	Leventis et al. (2004)
Grafito pirolítico	9,10-difenilantraceno	Adsorción mecánica	1.0-12.0	61.6 mV/pH	Leventis et al. (2004)
Grafito pirolítico	9,10-fenantraquinona	Adsorción mecánica	1.0-12.0	56.3 mV/pH	Leventis et al. (2004)
Grafito pirolítico	9-nitroantraceno	Adsorción mecánica	1.0-12.0	52.8 mV/pH	Leventis et al. (2004)
Grafito pirolítico	6-nitrocriseno	Adsorción mecánica	1.0-12.0	53.5 mV/pH	Leventis et al. (2004)
Grafito pirolítico	3-nitrofluoranteno	Adsorción mecánica	1.0-12.0	56.4 mV/pH	Leventis et al. (2004)
Fibra de carbono	Sal de diazonio Fast Blue RR: Cloruro de 4-Benzilamino-2,5-dimetoxibencenodiazonio hemi(cloruro de Zinc) sal	Unión covalente por voltamperometría cíclica mediante la química de unión de diazonio	6.5-8.0	38.0 mV/pH	Makos et al. (2010)
Grafito	9,10-fenantraquinona (en tinta de grafito)	Adsorción por goteo-evaporación	7.3-7.5	97.0 mV/pH	Musa et al. (2012)
Oro	o-quinona	Adsorción por inmersión	4.6-10.6	49.3 mV/pH	Park y Kim (2013)
Oro	Azul de toluidina	Electrodeposición seguida de <i>cross-linking</i>	3.0-6.0	57.0 mV/pH	Pöller y Schuhmann (2014)
Grafito pirolítico	Quinonas (en la superficie del electrodo)	-	1.0-13.0	57.0 mV/pH	Lu y Compton (2014a)
Carbón vítreo	Quinonas (en la superficie del electrodo)	-	1.0-13.1	59.0 mV/pH	Lu y Compton (2014b)
Grafito	Especies oxigenadas en la superficie del electrodo	-	1.8-13.1	57.0 mV/pH	Galdino et al. (2015)
Carbón pirolítico	Siringaldazina	Adsorción por inmersión	2.0-12.0	54.0 mV/pH	Michalak et al. (2015)

(Continuación)

Tabla 1: Sensores voltamperométricos de pH

Material del electrodo	Elemento de reconocimiento	Método de inmovilización	Intervalo de pH	Sensibilidad	Referencia
Carbón vítreo	Ácido salicílico	Adsorción por goteo-evaporación	4.0-9.0	62.0 mV/pH	Dai et al. (2015)
Carbón vítreo	Salicilaldehído	Adsorción por goteo-evaporación	2.0-10.0	60.4 mV/pH	Dai et al. (2015)
Platino	Fructosa	Adsorción por goteo-evaporación	3.0-11.0	24.0 mV/pH	Güngör et al. (2015)
Carbón vítreo	Polidopamina	Electropolimerización	1.0–12.0	58.2 mV/pH	Amiri et al. (2016)
Fibra de carbono	Quinonas (especies oxigenadas en la superficie del electrodo)	Oxidación de la fibra de carbono con KMnO ₄ 0.03M	2.0-8.0	64.0 mV/pH	Chaisiwamongkhol, K. et al. (2017)
Fibra de carbono con óxido de grafeno reducido	Siringaldazina	Adsorción por inmersión	5.7-7.5	57.0 mV/pH	Munteanu et al. (2018)
Carbón vítreo	Riboflavina	Adsorción por goteo-evaporación	1.0–11.0	53.4 mV/pH	Tham et al. (2019)
Diamante dopado con boro	Quinonas (en la superficie del electrodo)	-	4.0-10.0	62.0 mV/pH	Cobb et al. (2019)
Microdisco de Iridio	Óxido de Iridio	Electrodeposición	2.0-8.0	57.5 mV/pH	Chaisiwamongkhol, K. et al. (2019)
Oro	Derivado de indoanilina: 4-((4-aminofenil)imino)-2,6-dimetoxiciclohexa-2,5-dien-1-ona	<i>Cross-linking</i> con glutaraldehído	2.0–12.0	56.0 mV/pH	Vivaldi et al. (2020)
Grafeno poliláctico	Quinonas (especies oxigenadas en la superficie del electrodo)	Impresión 3D	2.0-11.2	60.0 mV/pH	Rabboh y O'Neil (2020)
Diamante dopado con boro	Quinonas (especies oxigenadas en la superficie del electrodo)	-	2.0-10.0	63.0 mV/pH	Lucio y Macpherson (2020)
GUITAR: carbono amorfo similar al grafito, de la universidad de Idaho	Quinonas (en la superficie del electrodo)	-	0.0-11.0	63.3 mV/pH	Zhu et al. (2020)
Carbón vítreo con Carbono de grafito mesoporoso	Polianilina	Adsorción por goteo-evaporación	2-11	58.0 mV/pH	Saikrithika y Kumar (2021)
Carbón vítreo	Poli-Rojo de alizarina S	Electropolimerización de rojo de alizarina S en membrana de Nafion	0-9	52.9 mV/pH	Grijalva Canales et al. (2022)

Capítulo III: Objetivos

3.1 Objetivo general

Desarrollar una plataforma voltamperométrica de pH mediante la inmovilización de una especie redox sensible al pH y evaluar su utilidad para la cuantificación de triglicéridos y glucosa.

3.2 Objetivos específicos

- 1.- Evaluar el comportamiento electroquímico en solución de especies redox sensibles al pH (rojo de alizarina y dopamina) por voltamperometría.
- 2.- Caracterizar el proceso de electropolimerización de la dopamina y el comportamiento electroquímico de la polidopamina por voltamperometría.
- 3.- Construir una plataforma voltamperométrica de pH con base en un electrodo de carbón vítreo y polidopamina.
- 4.- Optimizar la respuesta de la plataforma voltamperométrica de pH mediante el análisis de los factores de construcción que afectan su respuesta electroquímica.
- 5.- Caracterizar la plataforma voltamperométrica de pH mediante voltamperometría, espectroscopia de impedancia electroquímica, espectroscopia de infrarrojo y microscopia.
- 6.- Aplicar la plataforma voltamperométrica de pH para la medición del pH en diversas bebidas y como transductor para la cuantificación de triglicéridos y glucosa.

Capítulo IV: Metodología

4.1 Reactivos y materiales

Todas las soluciones fueron preparadas con reactivos comerciales de grado analítico: dopamina-HCl ($\geq 98\%$), rojo de alizarina S, KH_2PO_4 ($\geq 99\%$), K_2HPO_4 ($\geq 99.5\%$), CH_3COOH glacial ($\geq 99.7\%$), H_3BO_3 ($\geq 99.5\%$), NaOH ($\geq 97.0\%$), HCl (36.56%), $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($\geq 99.0\%$), $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($\geq 99.0\%$), tributirina (97%), KCl ($\geq 99\%$), goma arábica, α -D-glucosa ($\geq 99.5\%$), lipasa de *Candida rugosa* (EC 3. 1. 1. 3) $5.3 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína, glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* (EC 1.1.3.4) $100 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína (Sigma-Aldrich), Al_2O_3 con un tamaño de partícula de 0.3 micrómetros (Alfa Aesar) y Nafion 117 al 5% (mezcla de agua y alcoholes alifáticos de bajo peso molecular) (Fluka). Todas las soluciones fueron preparadas con agua desionizada con una resistividad $\geq 18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$.

4.2 Instrumentación

Todos los estudios voltamperométricos y de impedancia se llevaron a cabo a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) con un potenciostato Autolab PGSTAT302N Metrohm y el software NOVA 2.1, mediante una celda conformada por un electrodo de referencia de Ag/AgCl 4M KCl (0.199 vs NHE), un contraelectrodo de Pt (Basi MF-2013, 1.6 mm de diámetro), y un electrodo de trabajo de carbón vítreo (GC) (3 mm de diámetro, Basi MF-2012). La técnica voltamperométrica diferencial de pulso (DPV) se llevó a cabo bajo los siguientes parámetros: 30 s imponiendo el potencial de inicio del barrido, step de 0.005 V, amplitud de 0.025 V, tiempo de modulación de 0.05 s y un intervalo de tiempo de 0.5 s. La espectroscopia de impedancia electroquímica se realizó en el intervalo de frecuencias de 1 MHz a 1 KHz, amplitud de 5 mV, en una solución 5 mM de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 5 mM de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ y 0.05 M de KCl . Las medidas de pH se realizaron en un potenciómetro pH 510 Series Oakton con un electrodo combinado de pH.

Los espectros de infrarrojo se obtuvieron de un espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) Perkin Elmer Sytem 2000 con un barrido de 400 a 4000 cm^{-1} . Los espectros de IR de la dopamina (en polvo), membrana de Nafion y polidopamina reducida (presente en la membrana de Nafion) se obtuvieron en pastilla mientras que el de la polidopamina oxidada se obtuvo cuando esta estaba presente en la membrana de Nafion. El análisis por microscopía óptica se llevó a cabo con un Microscopio digital USB de mano de alta resolución Bodelin ProScope™ HR con lentes de 50x y 400x empleando el programa ProScope HR v1.2.1. La dispersión de tributirina y las muestras de triglicéridos se llevó a cabo en un equipo de ultrasonido Cole-Parmer 8890. El secado de la membrana de Nafion se realizó en una incubadora Boekel Scientific Model 132000. El análisis por microscopia electrónica de Barrido (SEM) se realizó en un equipo Jeol-IT-300 con el software IT-300 a 45x y 10000x y para el análisis por espectroscopia de energía dispersiva (EDS) se empleó el complemento de rayos X Oxford-X-Max con el software Aztec. Para el análisis por SEM se emplearon electrodos con un diámetro de 1.3 cm y 1 cm de altura con una zona de carbón vítreo con un diámetro de 2 mm. Estos electrodos se cubrieron con oro en una bomba de vacío DENTONVACUUM en un vacío de $5\text{-}6 \times 10^{-2}$ Torr.

Los valores de pKa empleados para la dopamina (H_3DA^+) se obtuvieron de Sánchez-Rivera et al. (2003), los de dopaminoquinona de Young y Babbitt, (1983), mientras que los valores de pKa de leucodopaminocromo (H_3LDAC^+), dopaminocromo ($HDAC^+$), 5,6-dihidroxiindol (H_3DHI^+) y 5,6-indolquinona (HIQ^+) (Tabla 2) se obtuvieron del programa disponible en línea MolGpKa, el cual predice los valores de pka, así como el sitio de ionización al cual corresponden, a partir de la estructura química de las moléculas. MolGpKa es un servidor web para la predicción de pKa mediante un modelo de red neuronal convolucional de gráficos. El modelo funciona aprendiendo automáticamente los patrones químicos relacionados con el pKa y creando predictores fiables con características aprendidas. Para el entrenamiento el modelo se utilizaron datos de las constantes de disociación ácida (pKa) de 1,6 millones de compuestos de la base de datos ChEMBL, una base de datos de moléculas bioactivas con propiedades farmacéuticas (Pan et al. 2021).

4.3 Análisis del comportamiento electroquímico de especies sensibles al pH en solución

Se estudió el comportamiento electroquímico de las especies sensibles al pH (Fig. 1): rojo de alizarina S (H_2ARS) y dopamina (H_3DA^+) en solución a una concentración 1 mM en buffer Britton-Robinson 0.05 M a diferentes valores de pH por voltamperometría cíclica en la ventana de potencial de -1 a +1 V, a una velocidad de barrido de 100 mV/s, durante dos ciclos, protegiendo las soluciones de dopamina de la luz para maximizar su estabilidad (Sánchez-Rivera et al. 2003). Debido a que la dopamina es inestable en solución también se caracterizó en atmósfera inerte de nitrógeno, burbujando nitrógeno durante cinco minutos por cada 10 ml de solución, antes de disolver la dopamina y manteniendo atmósfera inerte durante su estudio, igualmente se protegieron las soluciones de dopamina de la luz.

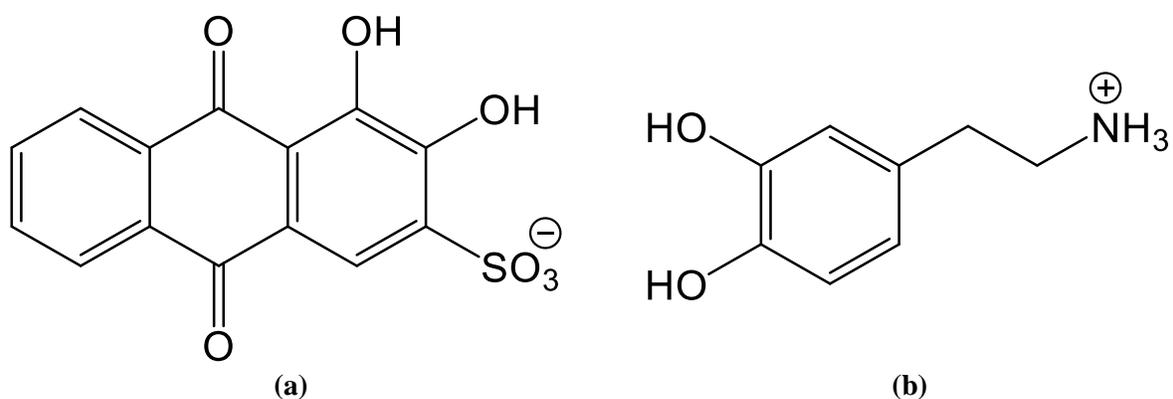


Figura 1: Estructura química de las especies sensibles al pH estudiadas. a) Rojo de alizarina S (H_2ARS). b) Dopamina (H_3DA^+).

4.4 Plataforma voltamperométrica de pH

4.4.1 Preparación del electrodo de carbón vítreo

El electrodo de carbón vítreo se pulió con una suspensión de alúmina al 1% hasta un acabado espejo y se enjuagó con agua desionizada antes de realizar cada experimento y de la construcción de cada plataforma voltamperométrica de pH (Fig. 2).

4.4.2 Construcción de la plataforma voltamperométrica de pH

4.4.2.1 Plataforma voltamperométrica de pH

Se preparó la plataforma voltamperométrica de pH basada en polidopamina siguiendo la metodología de Amiri et. al. (2016) sin ninguna modificación. Se introdujo el electrodo en una solución 5 mM de dopamina y se realizaron 5 barridos consecutivos por voltamperometría cíclica (CV) en la ventana de potencial -0.4 V a +1.5 V a una velocidad de 50 mV/s, en buffer de acetatos 0.1 M pH 5, protegiendo la solución de la luz.

Una vez construida, la plataforma voltamperométrica se evaluó realizando mediciones por CV en la ventana de potencial de -0.3 V a +0.8 V a una velocidad de barrido de 100 mV/s a diferentes valores de pH en buffer Britton-Robinson 0.05 M.

4.4.2.2 Plataforma voltamperométrica de pH con Nafion

Se depositaron 10 μ L de Nafion al 5% sobre la superficie del electrodo de carbón vítreo, se secó a 40 °C durante 30 minutos y luego se dejó atemperar por cinco minutos. Después, se introdujo el electrodo en una solución 5 mM de dopamina en buffer de fosfatos pH 7 y se realizaron 5 barridos consecutivos por CV en la ventana de potencial -0.4 V a +1.5 V a una velocidad de 50 mV/s, protegiendo la solución de la luz (Fig. 2). Posteriormente, se analizó la plataforma voltamperométrica de pH por voltamperometría diferencial de pulso (DPV) en la ventana de potencial de -0.3 V a +0.8 V a diferentes valores de pH: 1, 3, 5, 7 y 9 en buffer Britton-Robinson 0.05 M. Antes de cada medición se dejó que la membrana se acondicionara durante un minuto. El cambio al buffer de fosfatos pH 7 se realizó para mejorar la estabilidad y la electropolimerización de la dopamina ya que el aumento del pH mejora su electropolimerización y el buffer de acetatos disminuye su estabilidad y afecta negativamente su electropolimerización.

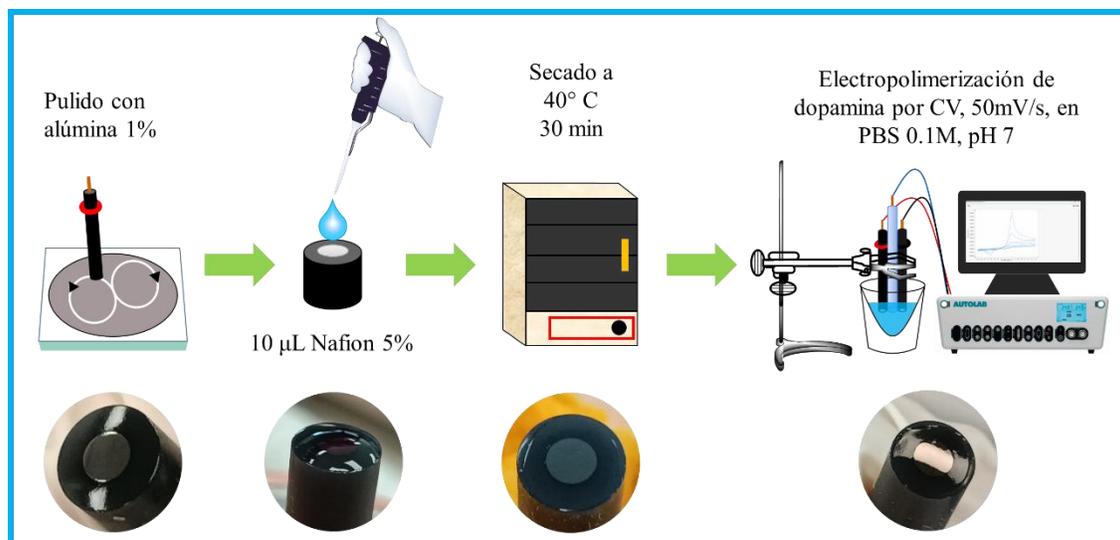


Figura 2: Construcción de la plataforma voltamperométrica de pH.

4.4.3 Optimización de la respuesta de la plataforma voltamperométrica de pH

Con el objetivo de mejorar la sensibilidad de la plataforma voltamperométrica de pH se realizó una optimización de la electropolimerización de la dopamina mediante un diseño Taguchi L₉ (3³) (Tabla 2) donde se optimizó la sensibilidad analítica del dispositivo. Los niveles de cada factor fueron elegidos de tal manera que se encontraran cercanos a las condiciones previamente reportadas por Amiri et al. (2016) que fueron 5 mM de dopamina, 5 ciclos y un intervalo de -0.4 V a +1.5 V. Las curvas se construyeron realizando mediciones a pH 1, 3, 5, 7, y 9 en buffer Britton-Robinson 0.05 M por DPV.

Tabla 2: Diseño de experimentos Taguchi L₉ (3³) para la optimización de la plataforma voltamperométrica de pH.

Niveles	Factores		
	A: Concentración de dopamina (mM)	B: Número de ciclos	C: Intervalo de potencial (V)
1	5	5	[-0.4 a +1.3]
2	7.5	10	[-0.4 a +1.4]
3	10	15	[-0.4 a +1.5]

Posteriormente, se determinaron los parámetros analíticos de la plataforma desarrollada: intervalo lineal, sensibilidad, repetitividad, reproducibilidad, precisión y exactitud comparando contra un electrodo de vidrio. También se determinó su estabilidad y su reproducibilidad en el proceso de construcción.

4.4.4 Caracterización de la plataforma voltamperométrica de pH

Se caracterizó la polidopamina presente en la plataforma voltamperométrica de pH por CV y DPV en buffer Britton-Robinson 0.05 M a partir de la polidopamina electropolimerizada en las condiciones óptimas. Se realizaron voltamperogramas cíclicos y diferenciales de pulso de la polidopamina a diferentes valores de pH en las ventanas de potencial de -0.5 a +1.0 V y de -0.5 a +0.8 V, respectivamente. Posteriormente, la polidopamina se sometió a procesos de oxidación a +1.0 V durante 20 minutos y de reducción a -0.5 V durante 20 minutos a pH 3.

La plataforma voltamperométrica de pH, también se caracterizó por espectroscopia de infrarrojo, microscopia óptica, microscopia electrónica de barrido y espectroscopia de impedancia electroquímica. La polidopamina y su proceso de óxido-reducción se caracterizó por IR analizando los espectros de la H_3DA^+ , la membrana de Nafion y la polidopamina oxidada y reducida presente en la membrana de Nafion. Para obtener los espectros de IR de la membrana de Nafion; así como de la polidopamina en su forma reducida y oxidada en la membrana de Nafion, las membranas se despegaron cuidadosamente de la superficie del electrodo de carbón vítreo. Para poder despegar las membranas de manera efectiva sin que sufrieran roturas o algún otro percance y fueran lo suficientemente resistentes y flexibles para su manipulación, estas membranas se prepararon a partir de 90 μ L de Nafion al 5% ya que cuando fueron preparadas con 30 μ L y 60 μ L no fue posible su adecuado despegue y manipulación. La microscopía electrónica de barrido se realizó a 45x y 10000x.

4.4.5 Aplicación de la plataforma voltamperométrica de pH

La plataforma voltamperométrica de pH se puso a prueba en la medición del pH de bebidas comerciales contrastando contra un electrodo de vidrio.

4.5 Biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos

4.5.1 Construcción del biosensor monoenzimático de triglicéridos

La metodología para la construcción del biosensor monoenzimático de triglicéridos se muestra en la figura 3. Primero se construye la plataforma voltamperométrica de pH en las condiciones optimizadas. Posteriormente, se depositan 20 μ L de un coctel enzimático compuesto por la enzima lipasa (EC 3. 1. 1. 3) (*Candida rugosa*), buffer de fosfatos 1mM pH 7 y Nafion al 5%, y se deja secar a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) durante 20 minutos. En un primer acercamiento a la construcción del biosensor, la plataforma se construyó en las condiciones óptimas de la señal C, y el coctel enzimático estuvo compuesto por la mezcla de 110 μ L de buffer de fosfatos 1 mM, 30 μ L de Nafion al 5% y 2 mg de lipasa. Una vez construido el biosensor, este fue evaluado mediante curvas de calibración con soluciones estándar de tributirina (Fig. 4).

La emulsión de tributirina (TB) 0.1 M, se preparó dispersando el reactivo en una solución de goma arábica al 4 % (p/v) como emulsionante. La mezcla generada se dispersó en un baño ultrasónico por 30 minutos.

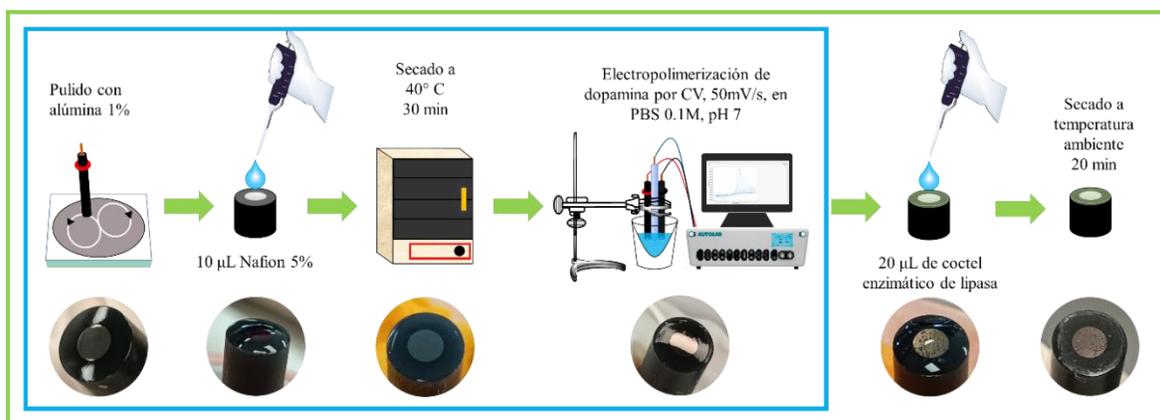


Figura 3: Construcción del biosensor monoenzimático de triglicéridos.

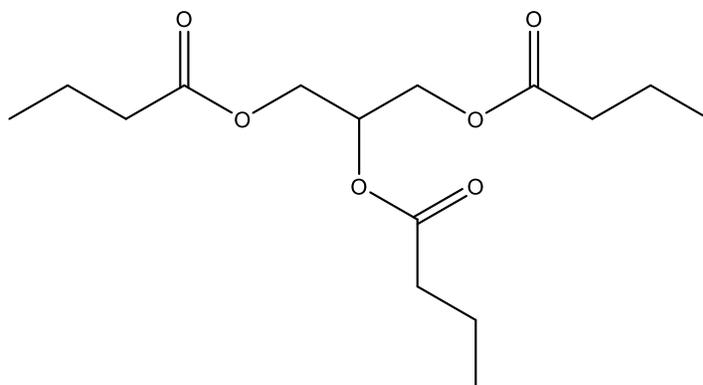


Figura 4: Estructura química de la tributirina.

4.5.2 Optimización del biosensor monoenzimático de triglicéridos

El biosensor monoenzimático de triglicéridos se optimizó de manera integral tomando en cuenta los factores de construcción de la plataforma voltamperométrica y del propio biosensor de triglicéridos, mediante un diseño de experimentos, un diseño Taguchi L_9 de cuatro factores a tres niveles (3^4) (Tabla 3). Los factores evaluados fueron la concentración de la dopamina, el número de ciclos de electropolimerización de la dopamina, la cantidad de enzima, y la cantidad de buffer de fosfatos más Nafion empleada para preparar el coctel enzimático. Una vez construido el biosensor, este fue evaluado mediante curvas de calibración con soluciones estándar de tributirina, iniciando el análisis en pH 7.3.

Una vez optimizado el biosensor monoenzimático de triglicéridos se prosiguió a determinar sus parámetros analíticos de sensibilidad, reproducibilidad, repetitividad e intervalo lineal.

Tabla 3: Diseño de experimentos Taguchi L₉ (3⁴) para la optimización integral del biosensor monoenzimático de triglicéridos.

Niveles	Factores			
	Concentración de Dopamina (mM)	No. ciclos	Enzima (mg)	Nafion + Buffer (μL)
1	5	5	2	20+120
2	10	10	3	30+110
3	15	15	4	40+100

4.5.3 Caracterización del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos

El biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos en las condiciones óptimas se caracterizó por espectroscopia de impedancia electroquímica y microscopia electrónica de barrido (SEM) a 45x y 10000x.

4.5.4 Aplicación del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos

El biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos en las condiciones óptimas se empleó para la cuantificación de triglicéridos en muestras de aceites comestibles. Para la preparación de las muestras se tomaron 200 μL del aceite, los cuales se dispersaron en baño ultrasónico durante 50 minutos en goma arábica 4%(p/v) y se diluyeron a 10 ml en una solución de goma arábica 4%(p/v). La cuantificación de triglicéridos se realizó por adición patrón, iniciando el análisis en pH 7.3. Se depositaron 100 μL de la solución de aceite en 12 ml de una solución de goma arábica 4%(p/v) y posteriormente se realizaron adiciones sucesivas de 20 μL de tributirina 0.1 M cada 10 minutos.

4.6 Biosensor voltamperométrico monoenzimático de glucosa

La metodología para la construcción del biosensor monoenzimático de glucosa se muestra en la figura 5. Similar al biosensor de triglicéridos, se construye inicialmente la plataforma voltamperométrica, se depositan 20 μL de un coctel enzimático, compuesto por la mezcla de la enzima glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4) (*Aspergillus niger*), buffer de fosfatos 1 mM pH 7 y Nafion al 5%, y se deja secar a temperatura ambiente durante 20 minutos (Fig. 5). En un primer acercamiento al desarrollo del biosensor monoenzimático de glucosa, este se preparó con la plataforma construida en las condiciones óptimas, y el coctel enzimático estuvo compuesto por la mezcla de 110 μL de buffer de fosfatos 1 mM, 30 μL de Nafion al 5% y 2 mg de glucosa oxidasa. El biosensor se evaluó con soluciones estándar de glucosa (Fig. 6).

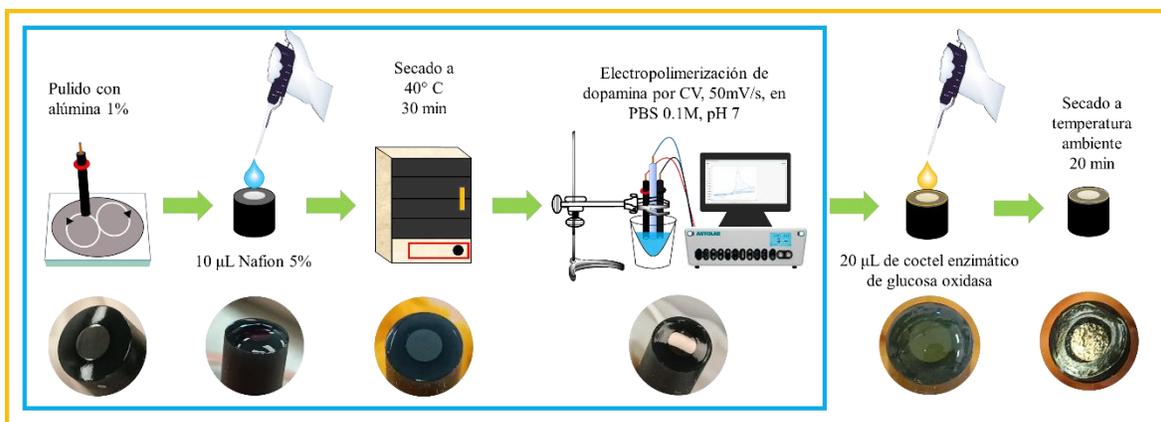


Figura 5: Construcción del biosensor monoenzimático de glucosa.

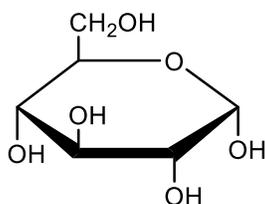


Figura 6: Estructura química de la glucosa.

Resultados

Capítulo V: Análisis del comportamiento electroquímico de especies sensibles al pH en solución

Como se mencionó anteriormente, la plataforma voltamperométrica de pH requiere de una especie redox que detecte el cambio de pH. Por lo que, se analizó el comportamiento electroquímico en solución del rojo de alizarina y la dopamina. Esto permitió identificar que la dopamina presenta una mayor sensibilidad e intervalo lineal y obtener información acerca de su electropolimerización, ya que su oxidación conlleva a su electropolimerización y la formación de la polidopamina. Esto último, es importante ya que para la construcción de la plataforma voltamperométrica, la polidopamina se obtuvo por electropolimerización de la dopamina, inmovilizando la especie sensible al pH.

5.1 Comportamiento electroquímico del Rojo de alizarina S en solución

En la figura 7 se presentan los voltamperogramas cíclicos del rojo de alizarina (H_2ARS) a diferentes valores de pH. Se observan cinco señales las cuales se desplazan hacia potenciales menores y su intensidad disminuye con el aumento del pH y el número de ciclos. La señal I corresponde a la oxidación del H_2ARS a 3,4,9,10-tetraoxo-3,4,9,10-tetrahidroantraceno-2-sulfonato (TTS) donde están involucrados dos protones y dos electrones (Dadpou y Nematollahi 2016). Se propone que la señal II corresponde a la reducción de uno de los grupos carbonilo del TTS a ARS^- donde se transfiere un electrón y un protón, la señal III a la reducción del ARS^- a H_2ARS donde está involucrada la transferencia de un electrón y un protón, la señal IV a la reducción del H_2ARS (la quinona a su forma hidroquinona) a 3,4,9,10-tetrahidroxiantraceno-2-sulfonato (THS) donde se transfieren dos electrones y dos protones y la señal V corresponde a la oxidación del THS a H_2ARS donde están involucrados dos electrones y dos protones (Fig. 8). Cabe aclarar que el pico anódico que se observa después de la señal IV, corresponde a la reducción de oxígeno ya que no se desoxigenó el medio.

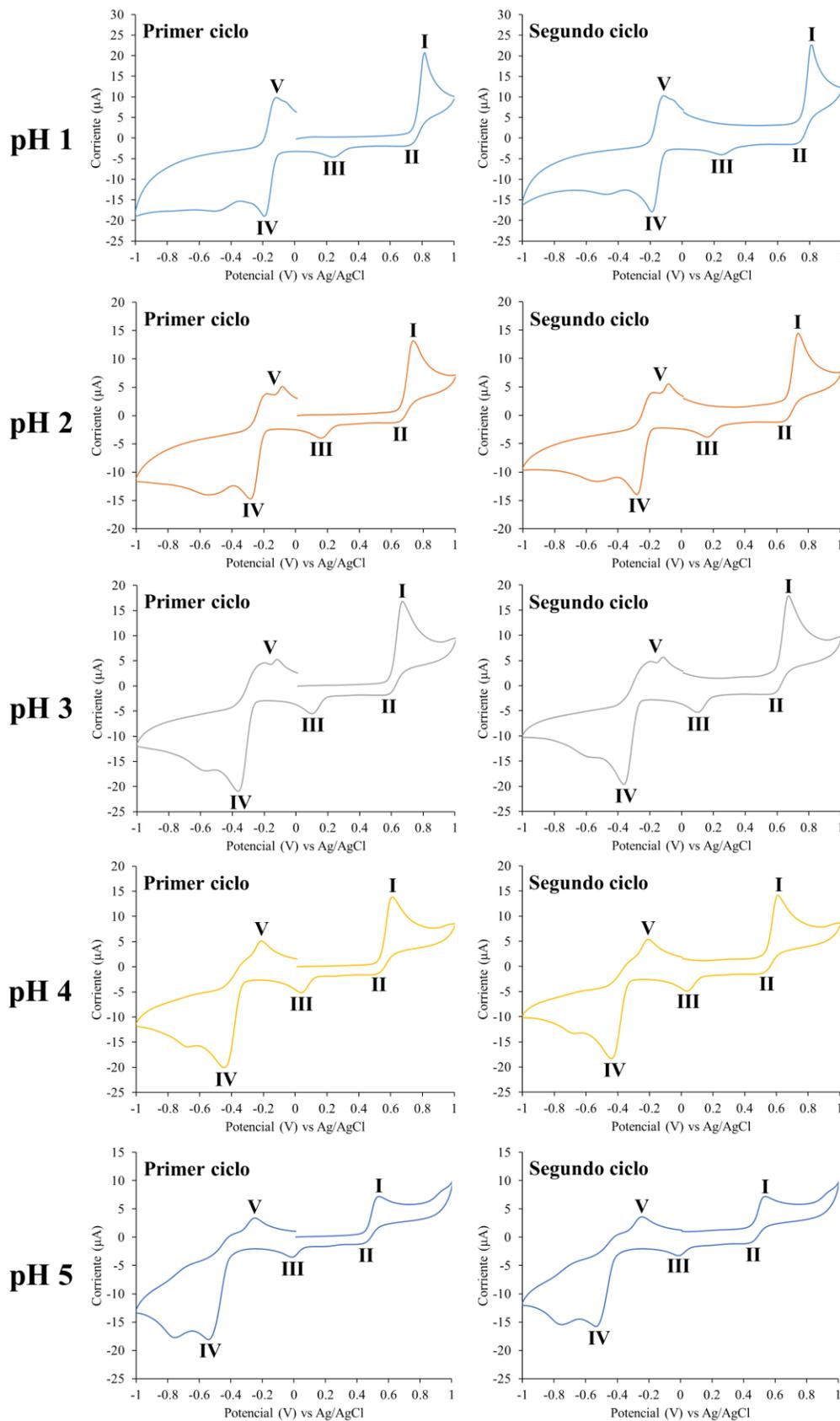


Figura 7: Voltamperogramas cíclicos del rojo de alizarina S (H_2ARS) 1 mM en buffer Britton-Robinson 0.05 M a diferentes valores de pH, velocidad de barrido: 100 mV/s, step: 0.01 V.

Capítulo V: Análisis del comportamiento electroquímico de especies sensibles al pH en solución

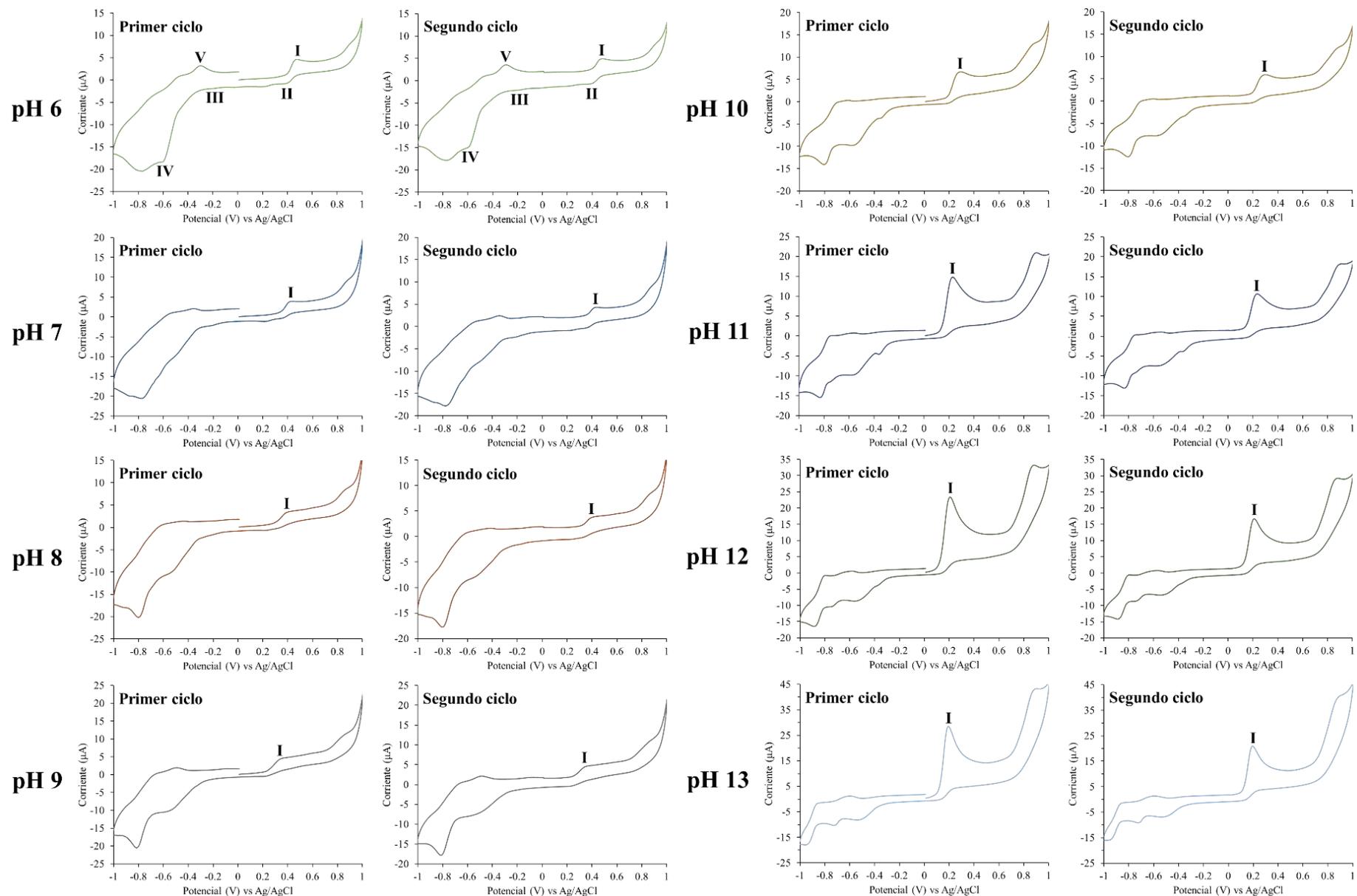


Figura 7 (Continuación): Voltamperogramas cíclicos del rojo de alizarina S (H_2ARS) 1 mM en buffer Britton-Robinson 0.05 M a diferentes valores de pH, velocidad de barrido: 100 mV/s, step: 0.01 V.

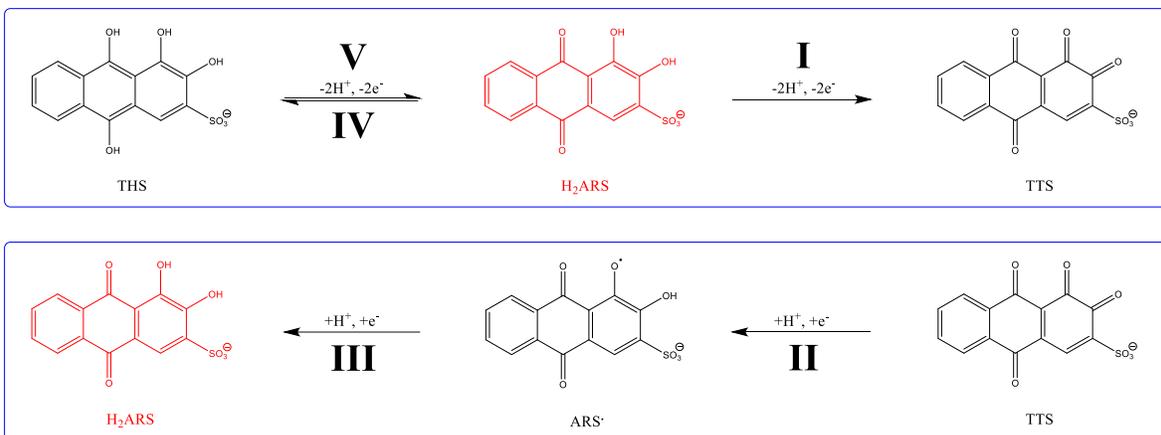


Figura 8: Reacciones de óxido-reducción del rojo de alizarina (H₂ARS).

La asignación de las señales anteriormente descrita, se basa en que la señal III aparece únicamente después de que se presenta la señal I (Fig. 9). Barriendo a partir de potencial de corriente nula en sentido catódico, en la figura 9a, se observa que en el primer ciclo únicamente aparecen las señales IV, V, I y II, pero no la III, la cual aparece a partir del segundo ciclo, mientras que en la figura 9b, barriendo a partir de potencial de corriente nula en sentido anódico aparecen las señales I-V desde el primer ciclo. Por lo que se asocia, que la señal de reducción III está relacionada con la oxidación de la señal I.

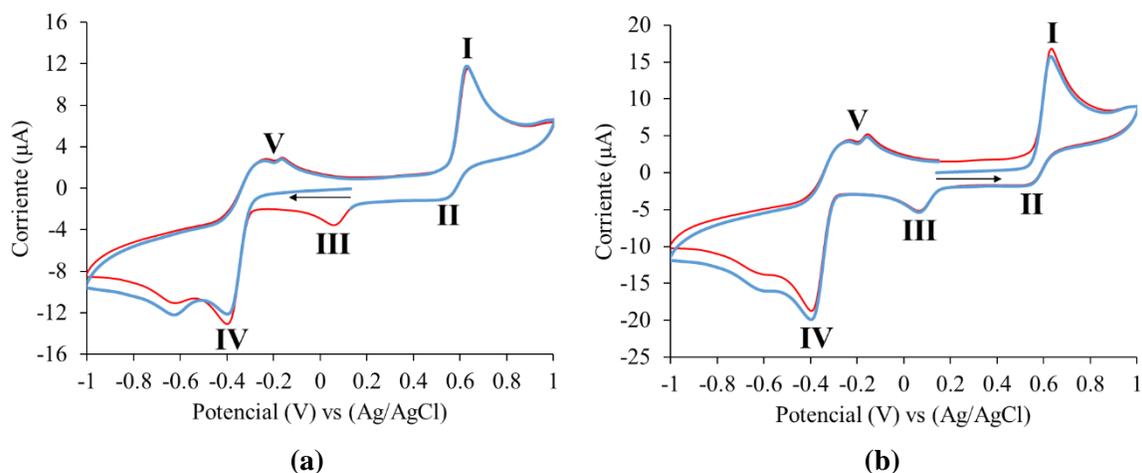


Figura 9: Voltamperogramas cíclicos del rojo de alizarina S a partir de potencial de corriente nula en buffer Britton-Robinson 0.05 M pH 3 (azul: primer ciclo, rojo: segundo ciclo). a) En sentido catódico. b) En sentido anódico.

La curva de potencial contra pH de la señal I (Fig. 10) tiene una sensibilidad de 52 mV/pH en el intervalo de pH de 1 a 13. Se observan tres secciones lineales con diferente valor de sensibilidad, una de pH 1 a 5 con una sensibilidad de 66 mV/pH, una segunda sección de 6 a 10 con una sensibilidad de 45 mV/pH y una tercera de 11 a 12 con sensibilidad de 20 mV/pH. Para explicar este comportamiento se construyó el diagrama tipo Pourbaix mediante el Método de Especies y Equilibrios Generalizados (Trejo Córdova et al. 1993; Rojas Hernández, 1995) para el par TTS/H₂ARS (Fig. 10) a partir de los valores de pKa del H₂ARS: pKa₁=5.49 pKa₂=10.85 reportados por Zittel y Florence (1967) y el valor del potencial normal del par TTS/H₂ARS de +0.800 ± 0.005 V (vs Ag/AgCl) calculado a partir de los voltamperogramas cíclicos del rojo de alizarina S (Fig.7). Para esto se traza una línea recta entre el pico de oxidación y el de reducción y se toma el valor del potencial donde la línea cruza en el eje del potencial (valor a corriente cero). Este procedimiento se realiza para cada uno de los distintos pH. Entonces se grafican estos potenciales contra el pH y a partir de la regresión lineal se extrapola el valor a pH cero. Este valor de potencial a pH cero es el potencial normal.

En el diagrama tipo Pourbaix se observa una zona lineal de pH 0 a 5.49 con una sensibilidad de 59 mV/pH, luego una de 29 mV/pH de 5.49 a 10.85 y luego una con una sensibilidad de cero. Este comportamiento se debe al efecto de los equilibrios acido-base del H₂ARS en el potencial normal aparente y como se observa en la figura 10 el comportamiento electroquímico del H₂ARS es congruente con el predicho por el diagrama Pourbaix. Las señales II, III y V presentan igualmente un comportamiento nernstiano en la curva de potencial contra pH (Tabla 4), lo que indica la transferencia de un número igual de protones que de electrones. Mientras que la señal IV posee una sensibilidad de 85.5 mV/pH que se atribuye al efecto de la reducción de agua ya que no se desoxigenó el medio. También se observa que a pH ácido la señal V se desdobra en dos picos cada uno correspondiente a la oxidación de un grupo alcohol de la hidroquinona.

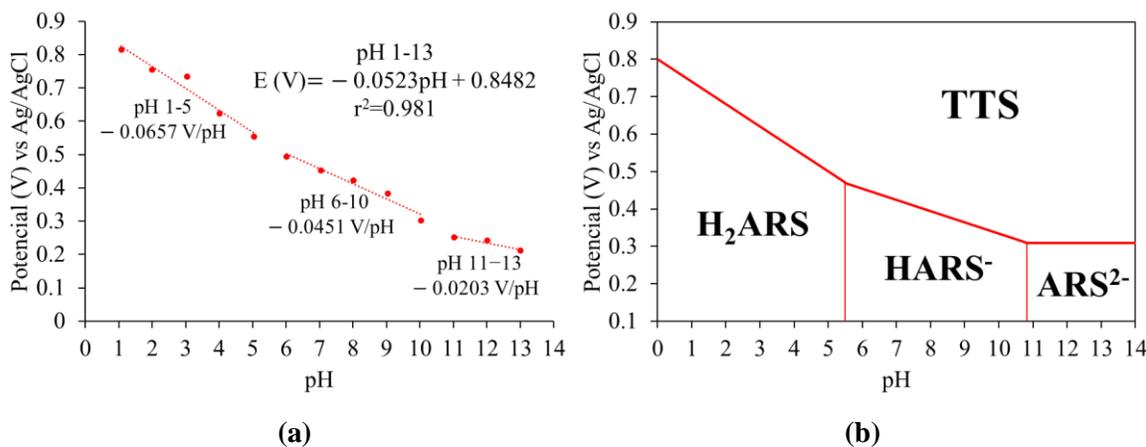


Figura 10: a) Curva de calibración potencial contra pH a partir de la señal de oxidación I del rojo de alizarina (H₂ARS). b) Diagrama tipo Pourbaix para el par TTS/H₂ARS.

Tabla 4: Sensibilidad de las señales de óxido-reducción del rojo de alizarina S (H₂ARS).

Señal	I	II	III	IV	V
Sin desoxigenación	52.3 ± 2.2 mV/pH	66.7 ± 2.4 mV/pH	64.7 ± 2.9 mV/pH	85.5 ± 2.7 mV/pH	53.5 ± 3.8 mV/pH

En la literatura se ha reportado que rojo de alizarina S se puede electropolimerizar sobre la superficie de electrodos de carbón vítreo para formar poli-rojo de alizarina S (Zhang et al. 2014a; Hatefi-Mehrjardi et al. 2014; Mümin et al. 2016; Filik et al. 2017; Dawit et al. 2020; Farias et al. (2021), que las señales de poli-rojo de alizarina son sensibles al pH (Reddaiah et al. 2016) y se ha empleado el poli-rojo de alizarina en el desarrollo de un sensor voltamperométrico de pH con una sensibilidad de 52.9 mV/pH en un intervalo de 0 a 9 (Grijalva Canales et al. 2022).

5.2 Comportamiento electroquímico de la dopamina en solución

La dopamina (H₃DA⁺) posee tres protones ácidos correspondientes al grupo amino y a los dos grupos fenol. En la figura 11 se muestra la identidad de las especies ácido-base determinada por Corona-Avenidaño et. al. (2007a) y el diagrama de distribución de especies de la dopamina construido a partir de los valores de pka obtenidos experimentalmente por Sánchez-Rivera et. al. (2003), quienes tomaron en consideración la estabilidad de la H₃DA⁺ en solución, ya que es sensible a la luz, al aire y al pH. Se puede notar que la primera disociación ácida corresponde al grupo amino y que a un pH ácido-neutro (≤ 7) la H₃DA⁺ se encuentra totalmente protonada. Este análisis fue útil para identificar a que pH la H₃DA⁺ es más estable en solución, la identidad de la especie de H₃DA⁺ que se oxida cuando se analizó su comportamiento electroquímico y la especie de H₃DA⁺ que se presenta en las condiciones de electropolimerización, a partir de la cual se propuso un mecanismo de electropolimerización de la H₃DA⁺; además de explicar la aparición de las señales relacionadas con la oxidación de la H₃DA⁺,

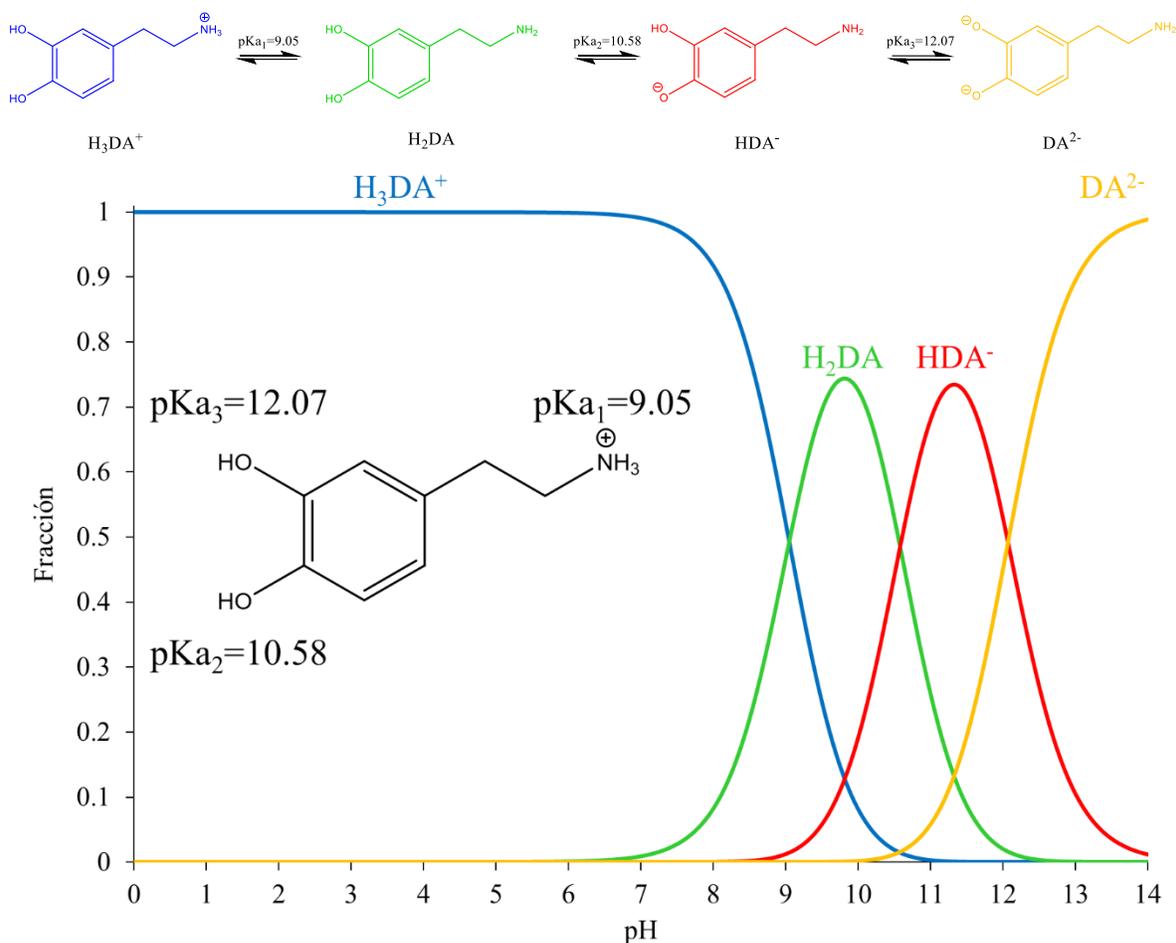


Figura 11: Diagrama de distribución de especies de la dopamina (H_3DA^+).

5.2.1 Comportamiento electroquímico de la dopamina en solución sin desoxigenación

A pH ácido ($pH \leq 5$) la H_3DA^+ presenta una señal de oxidación y una de reducción en el primero y segundo ciclos (Fig. 12). La señal I corresponde a la oxidación de la H_3DA^+ a dopaminoquinona ($HDAQ^+$) y la señal II a la reducción de $HDAQ^+$ a H_3DA^+ (Fig. 13), en cuyo proceso de óxido-reducción se transfieren dos protones y dos electrones (Li et. al. 2006; Huang et. al. 2012; Ismail et. al. 2016; Muguruma et. al. 2016; Bacil et. al. 2019). También se observa la señal de reducción de oxígeno alrededor de -0.7 V.

A partir de pH 6 se observan la aparición de las señales III y IV (Fig. 12). La señal III corresponde a la reducción de dopaminocromo ($HDAC^+$) a leucodopaminocromo (H_3LDAC^+) y la señal IV a la oxidación de H_3LDAC^+ a $HDAC^+$, en la cuales se transfieren dos protones y dos electrones (Fig. 13) (Li et. al. 2006; Ismail et. al. 2016; Muguruma et. al. 2016; Bacil et. al. 2019, Young y Babbitt, 1983). La aparición de estas señales se debe a que conforme se oxida la H_3DA^+ a $HDAQ^+$, la $HDAQ^+$ se desprotona parcialmente a DAQ ($pK_a=9.85$) (Young y Babbitt, 1983) y sufre una ciclación intramolecular por medio de la

adición 1,4 de Michael para formar leucodopaminocromo (H_3LDAC^+) (Fig. 13). Este proceso se ve favorecido con el aumento del pH (Li et al. 2006). El H_3LDAC^+ al estar a un potencial mayor al de su oxidación (Fig. 16d), se oxida a dopaminocromo ($HDAC^+$) (Fig. 13) (Ismail et. al. 2016). Así, la reducción de $HDAC^+$ a H_3LDAC^+ da lugar a la señal III y la oxidación de H_3LDAC^+ a $HDAC^+$ a la señal IV, en la cuales se transfieren dos protones y dos electrones (Fig. 13) (Li et. al. 2006; Ismail et. al. 2016; Muguruma et. al. 2016; Bacil et. al. 2019, Young y Babbitt, 1983).

En el primer ciclo se observan las señales I, II y III (Fig. 12). La señal I, que corresponde a la oxidación de H_3DA^+ a $HDAQ^+$, también tiene contribución de la oxidación de H_3LDAC^+ a $HDAC^+$ (Fig. 13). Una vez formados la $HDAQ^+$ y $HDAC^+$ en la señal I, la señal II corresponde a la reducción de la $HDAQ^+$ (que no se transformó químicamente) a H_3DA^+ y la señal III a la reducción de $HDAC^+$ (que se formó en I) a H_3LDAC^+ . Una vez formado el H_3LDAC^+ en el primer ciclo, en el segundo ciclo se observa la señal IV de oxidación de H_3LDAC^+ a $HDAC^+$. La señal III (reducción de $HDAC^+$ a H_3LDAC^+) sirve de evidencia de la formación de H_3LDAC^+ y $HDAC^+$ en la señal I. También se puede observar que la intensidad de las señales I y II disminuyen con el aumento en el número de ciclos ya que la H_3DA^+ y $HDAQ^+$ se transforman en especies descritas con anterioridad. Es importante señalar que si bien el valor de pK_a de la $HDAQ^+$ es mayor a los pH mostrados (6-9), por principio de Le Chatelier el equilibrio ácido-base esta desplazado hacia productos, pues el DAQ se transforma químicamente a H_3LDAC^+ .

A partir de pH 8 se observa la aparición de la señal V en el segundo ciclo (Fig. 12). Esta señal corresponde a la oxidación del 5,6-dihidroindol (H_3DHI^+) a 5,6-indolquinona (HIQ^+) (Fig. 13), donde están involucrada la transferencia de dos protones y dos electrones (Young y Babbitt 1983, Muguruma et. al. 2016). Esto se debe a que el $HDAC^+$ que se formó en la señal IV se isomeriza a H_3DHI^+ , y este se oxida a HIQ^+ (Fig. 13). A partir de pH 7 también se observa la aparición de otras señales de oxidación relacionadas con la H_3DA^+ que aún no han sido identificadas, pero se reportan en Li et al. (2019).

En la figura 12 se observa que las cinco señales son sensibles al pH, se desplazan a potenciales menores con el aumento del pH. Las señales I a IV presentan un comportamiento nernstiano (Tabla 6) como se reporta en (Li et. al. 2006).

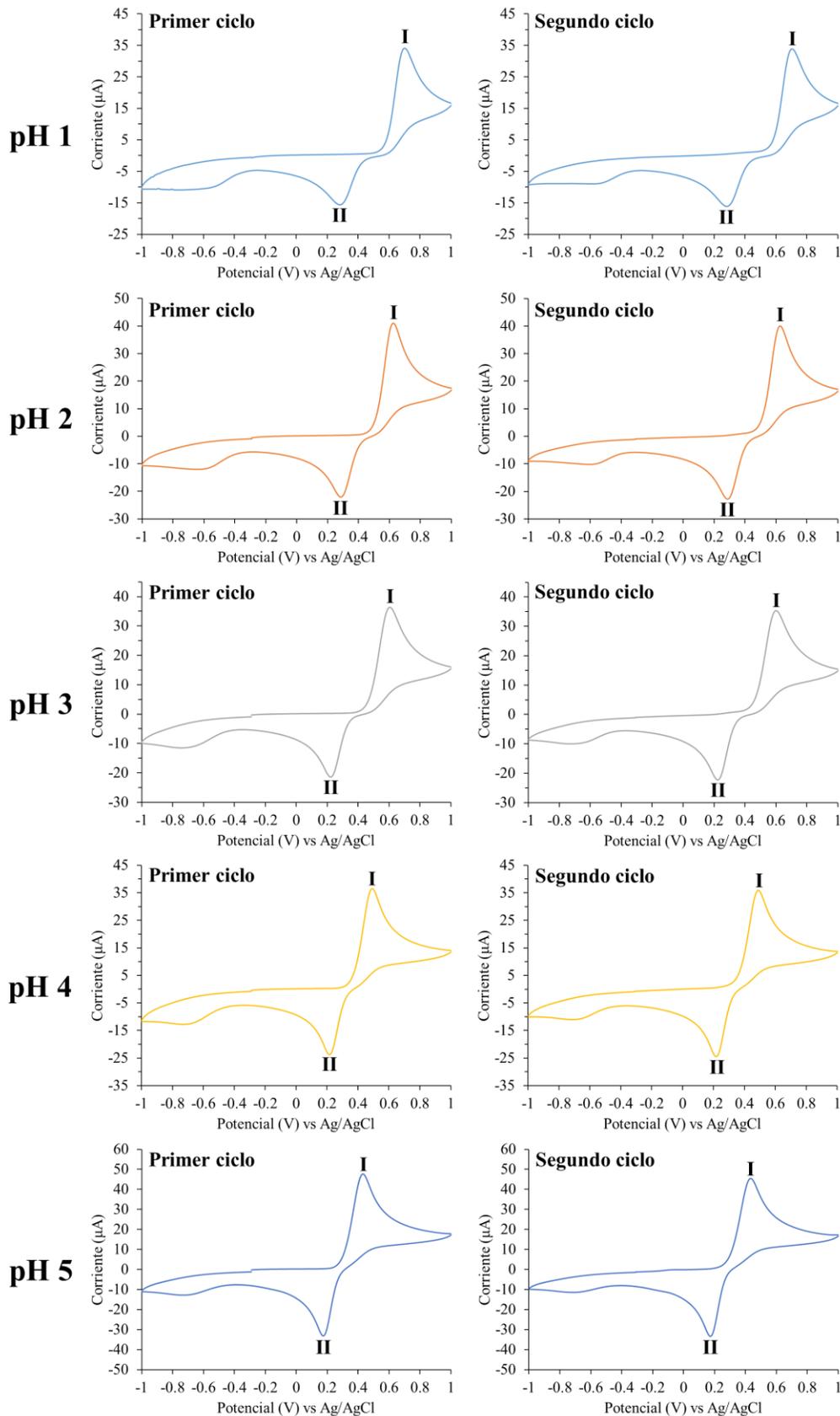


Figura 12: Voltamperogramas cíclicos de la dopamina (H_3DA^+) 1mM en buffer Britton-Robinson 0.05 M a diferentes valores de pH, velocidad de barrido: 100 mV/s, step: 0.01 V, sin desoxigenación.

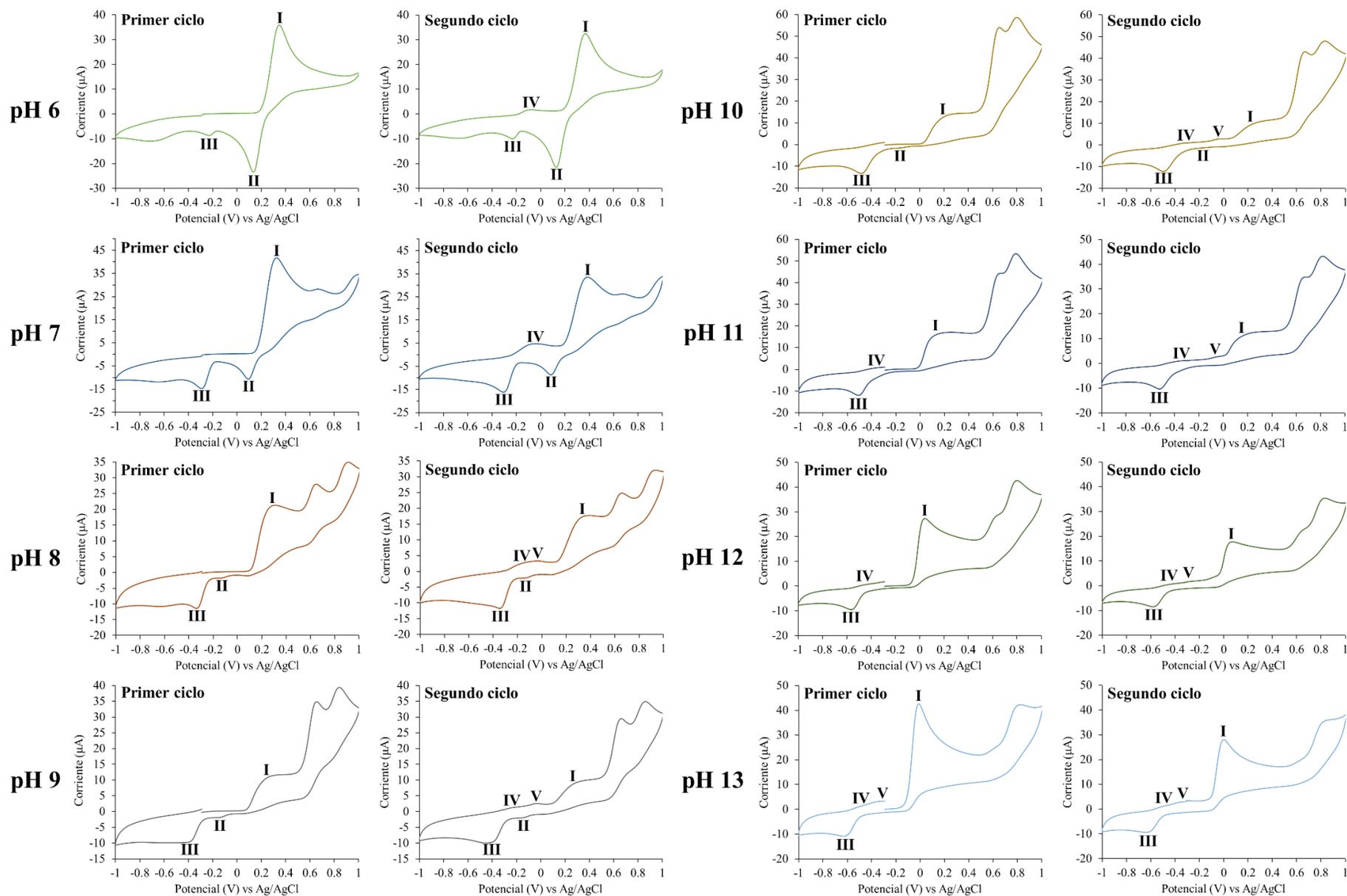


Figura 12 (Continuación): Voltamperogramas cíclicos de la dopamina (H_3DA^+) 1mM en buffer Britton-Robinson 0.05 M a diferentes valores de pH, velocidad de barrido: 100 mV/s, step: 0.01 V, sin desoxigenación.

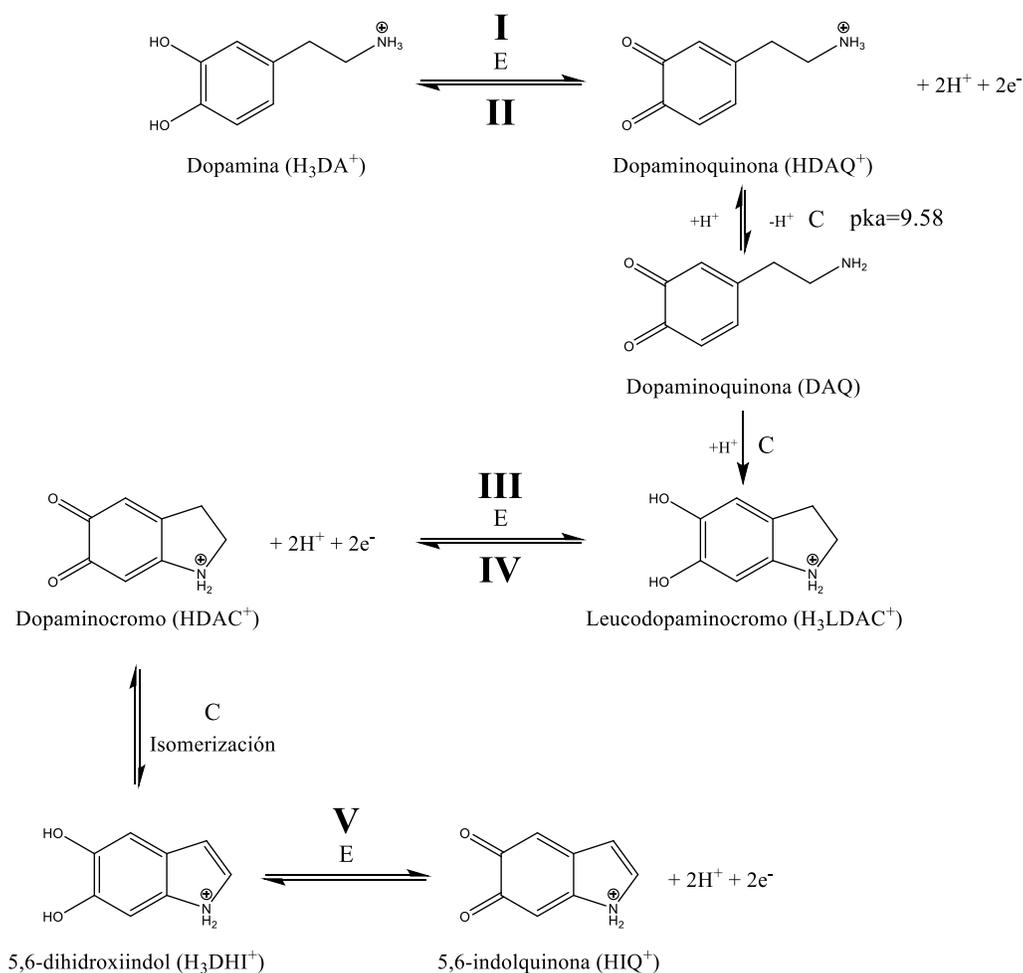


Figura 13: Reacciones involucradas en la oxidación de la dopamina (H₃DA⁺).

5.2.2 Comportamiento electroquímico de la dopamina en solución con desoxigenación

En la figura 14 se presentan los voltamperogramas cíclicos de la H₃DA⁺ en solución a diferentes valores de pH en condiciones desoxigenadas. Se observa la aparición de las mismas cinco señales que se observaron en condiciones oxigenadas. A pH ácido (≤ 5) se observan las señales I y II (Fig. 14) correspondientes a la reacción de óxido-reducción de H₃DA⁺/dopaminoquinona (HDAQ⁺) (Fig. 13), en la cual están involucrados dos protones y dos electrones (Li et al. 2006; Huang et al. 2012; Ismail et al. 2016; Muguruma et al. 2016; Bacil et al. 2019). A partir de pH 6 se observan la aparición de las señales III y IV (Fig. 14) relacionadas con el proceso de óxido-reducción de leucodopaminocromo (H₃LDAC⁺)/dopaminocromo (HDAC⁺) en el cual están involucrados dos protones y dos electrones (Fig. 13) (Li et al. 2006; Ismail et al. 2016; Muguruma et al. 2016; Bacil et al. 2019, Young y Babbitt 1983). A partir de pH 7 se observa la aparición de la señal V en el segundo ciclo (Fig. 14) que corresponde a la oxidación del 5,6-dihidroxiindol (H₃DHI⁺) a 5,6-indolquinona (HIQ⁺) (Fig. 13), donde está involucrada la transferencia de dos protones y dos electrones (Young y Babbitt 1983; Ismail et al. 2016; Muguruma et al. 2016).

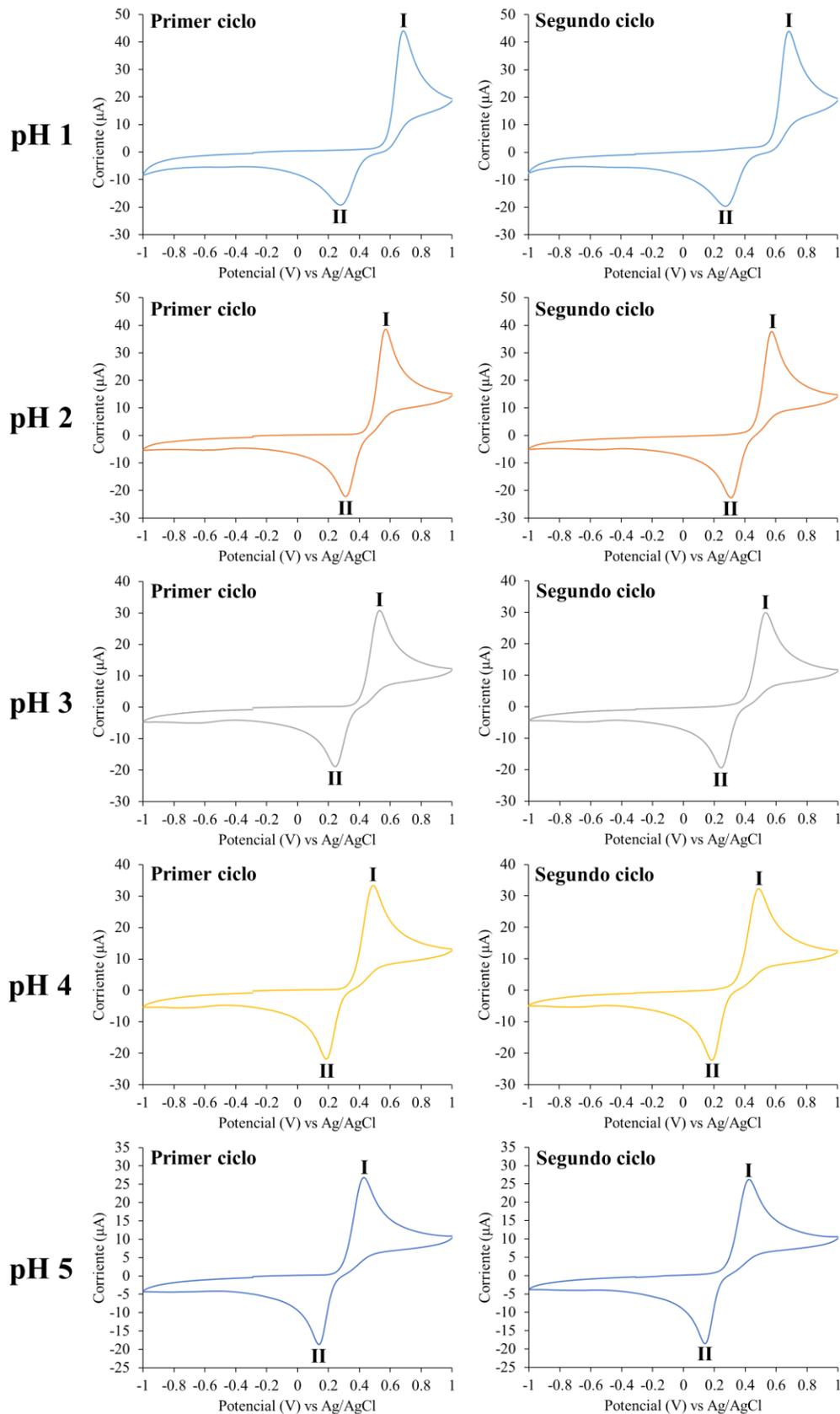


Figura 14: Voltamperogramas cíclicos de la dopamina (H_3DA^+) 1mM en buffer Britton-Robinson 0.05 M a diferentes valores de pH, velocidad de barrido: 100 mV/s, step: 0.01 V, en condiciones desoxigenadas.

Capítulo V: Análisis del comportamiento electroquímico de especies sensibles al pH en solución

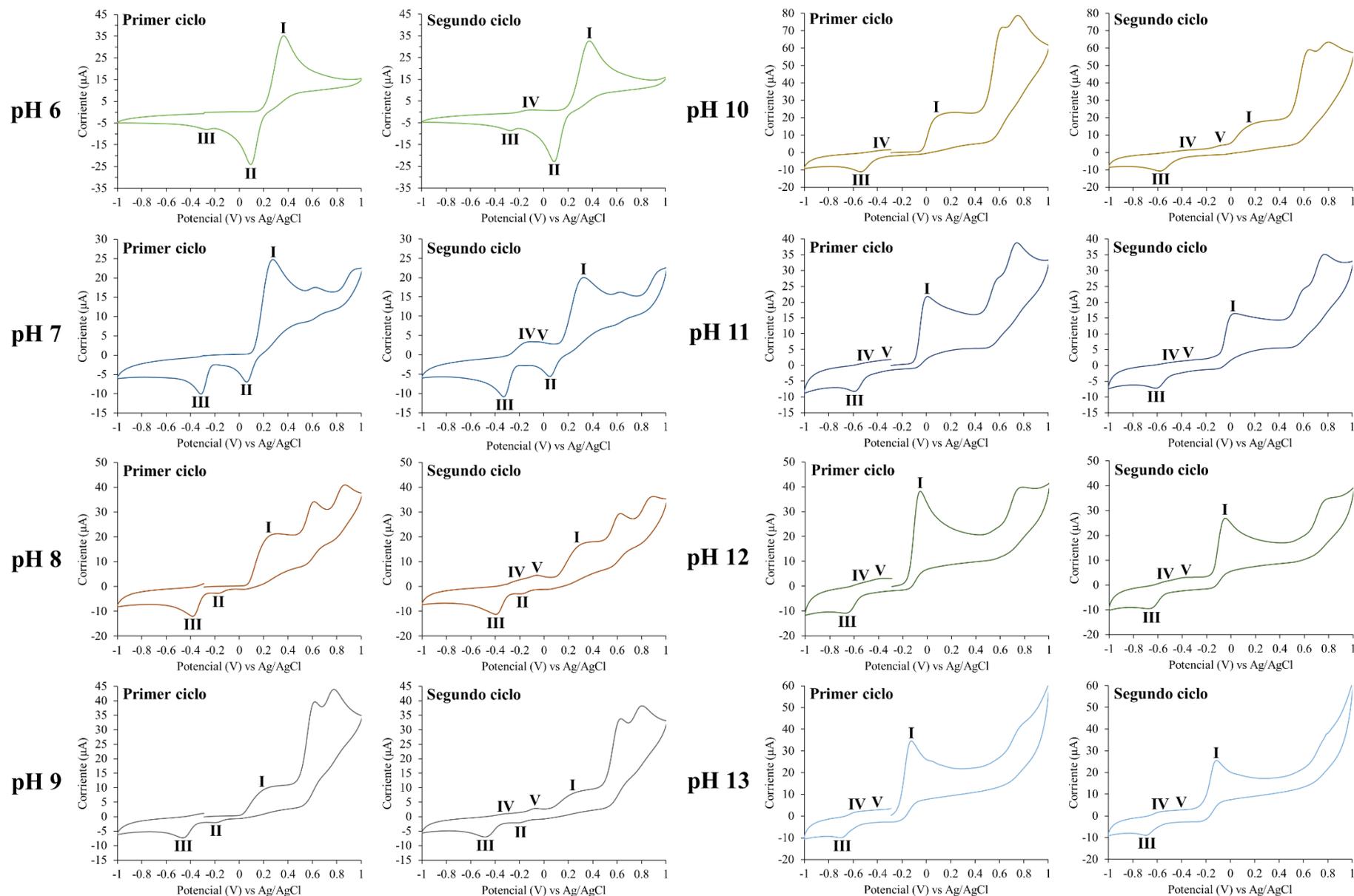


Figura 14 (Continuación): Voltamperogramas cíclicos de la dopamina (H_3DA^+) 1mM en buffer Britton-Robinson 0.05 M a diferentes valores de pH, velocidad de barrido: 100 mV/s, step: 0.01 V, en condiciones desoxigenadas.

Las cinco señales son sensibles al pH, se desplazan a potenciales menores y su intensidad disminuye con el aumento del pH. También se observa que con el aumento del pH y el número de ciclos las señales I y II disminuyen de intensidad pues la H_3DA^+ y $HDAQ^+$ se están transformando. Las señales I a IV presentan un comportamiento nernstiano (Tabla 5) como se reporta en (Li et. al. 2006). Igual que en el caso de las condiciones con oxígeno a partir de pH 7 a potencial mayor a +0.5 V se observan señales relacionadas con la oxidación de la dopamina pero que aún no han sido identificadas, pero se reportan en Li et al. (2019).

Tabla 5: Sensibilidad de las señales de óxido-reducción de la dopamina (H_3DA^+).

Señal	I	II	III	IV	V
Proceso	$H_3DA^+ \rightarrow HDAQ^+$	$HDAQ^+ \rightarrow H_3DA^+$	$HDAC^+ \rightarrow HLDAC^+$	$HLDAC^+ \rightarrow HDAC^+$	$HDHI^+ \rightarrow HIQ^+$
Sin desoxigenación	57.7 ± 1.6 mV/pH	55.6 ± 6.5 mV/pH	57.0 ± 1.7 mV/pH	66.6 ± 3.1 mV/pH	67.0 ± 18.2 mV/pH
Con desoxigenación	65.6 ± 1.8 mV/pH	63.9 ± 8.5 mV/pH	66.6 ± 2.4 mV/pH	72.1 ± 3.7 mV/pH	71.0 ± 11.6 mV/pH

Comparando los voltamperogramas cíclicos en ambas condiciones, se observa que las señales obtenidas en las condiciones desoxigenadas son más intensas y mejor definidas. También, en condiciones desoxigenadas a pH 7 ya se logró observar la señal V (Fig. 14), mientras que en condiciones sin desoxigenar esta solo aparece a partir de pH 8 (Fig. 12), esto se atribuye a que el oxígeno ya no interfiere (Salomäki et al. 2018).

Como ya se ha mencionado anteriormente, en ambas condiciones, las señales I a IV presentan un comportamiento nernstiano (Tabla 5). En la figura 15 se presentan las curvas de potencial contra pH construidas a partir de los potenciales de oxidación de la dopamina (señal I) en ambas condiciones. Se observa que la señal I posee un comportamiento nernstiano con buena linealidad en un amplio intervalo de pH de 1 a 13, como se ha reportado previamente en Li et. al. (2006) y Huang et al. (2012). Un análisis estadístico t de student para la comparación de pendientes ($p \leq 0.05$) mostró que las sensibilidades de la señal I en condiciones sin desoxigenar y desoxigenadas son estadísticamente diferentes.

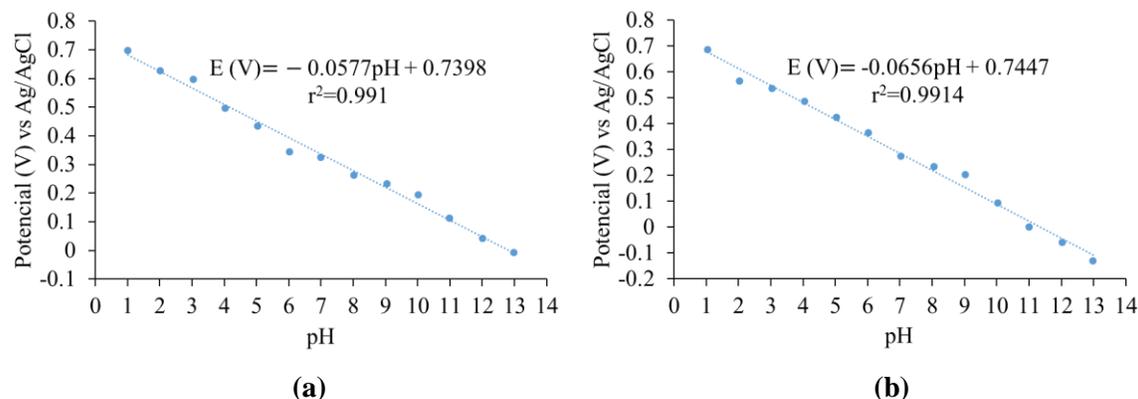


Figura 15: Curva de potencial contra pH para la señal de oxidación de la dopamina (H_3DA^+). a) Sistema sin desoxigenar. b) Sistema desoxigenado.

Para poder corroborar este compartimento se construyeron los diagramas Tipo Pourbaix (Fig. 16), para los tres pares involucrados en la oxidación de la dopamina, mediante el Método de Especies y Equilibrios Generalizados (Trejo Córdova et al. 1993; Rojas Hernández 1995). Para construir el diagrama se emplearon los valores de pKa reportados para la dopamina y dopaminocromo y los estimados por el programa en línea Molgpka para las demás especies involucradas en la oxidación de la dopamina (Tabla 2) y se calcularon los potenciales normales para los tres pares a partir de los voltamperogramas ciclos en ambas condiciones (Tabla 6) mediante la metodología mencionada con anterioridad, en la cual se traza una línea recta entre el pico de oxidación y el de reducción y se toma el valor del potencial donde la línea cruza en el eje de potencial (valor a corriente cero) para cada uno de los pH. Entonces se grafican estos potenciales contra el pH y a partir de la regresión lineal se extrapola el valor a pH cero, donde este potencial a pH cero es el potencial normal.

Tabla 6: Potenciales normales (V) de los pares involucrados en la oxidación de la dopamina (H_3DA^+) (vs Ag/AgCl) obtenidos a partir de los voltamperogramas cíclicos de la dopamina (H_3DA^+).

Condiciones	Pares		
	HDAQ ⁺ /H ₃ DA ⁺	HDAC ⁺ /H ₃ LDAC ⁺	HIQ ⁺ /H ₃ DHI ⁺
Sin desoxigenación	0.558 ± 0.044	0.287 ± 0.020	0.431 ± 0.194
Con desoxigenación	0.560 ± 0.052	0.300 ± 0.023	0.430 ± 0.119

En la tabla 6 se puede notar que el par HDAQ⁺/H₃DA⁺, presenta el potencial normal más grande, mientras que el par HDAC⁺/H₃LDAC⁺ presenta el menor y que el potencial de HIQ⁺/H₃DHI⁺ se encuentra entre estos dos valores. Estos datos presentan la misma tendencia en ambas condiciones lo que nos habla que proteger la solución de la H₃DA⁺ de la luz es suficiente para mantenerla estable. El valor del potencial del par HDAQ⁺/H₃DA⁺ es congruente con el presentando en Lin et al. (2017).

En la figura 16 se presentan los diagramas tipo Pourbaix para los tres pares, en los que se observa principalmente una zona lineal con una sensibilidad de 59 mV/pH de pH 0 a 9 y a $\text{pH} > 9$ se observan zonas lineales con sensibilidades de diferente valor, sin embargo, en las curvas potencial contra pH de las señales I, II, III y IV a $\text{pH} > 9$ no se observa este comportamiento debido a que las zonas lineales son reducidas y el análisis se realizó con incrementos de una unidad de pH, de tal manera que no se pueden detectar estas regiones mediante el procedimiento realizado.

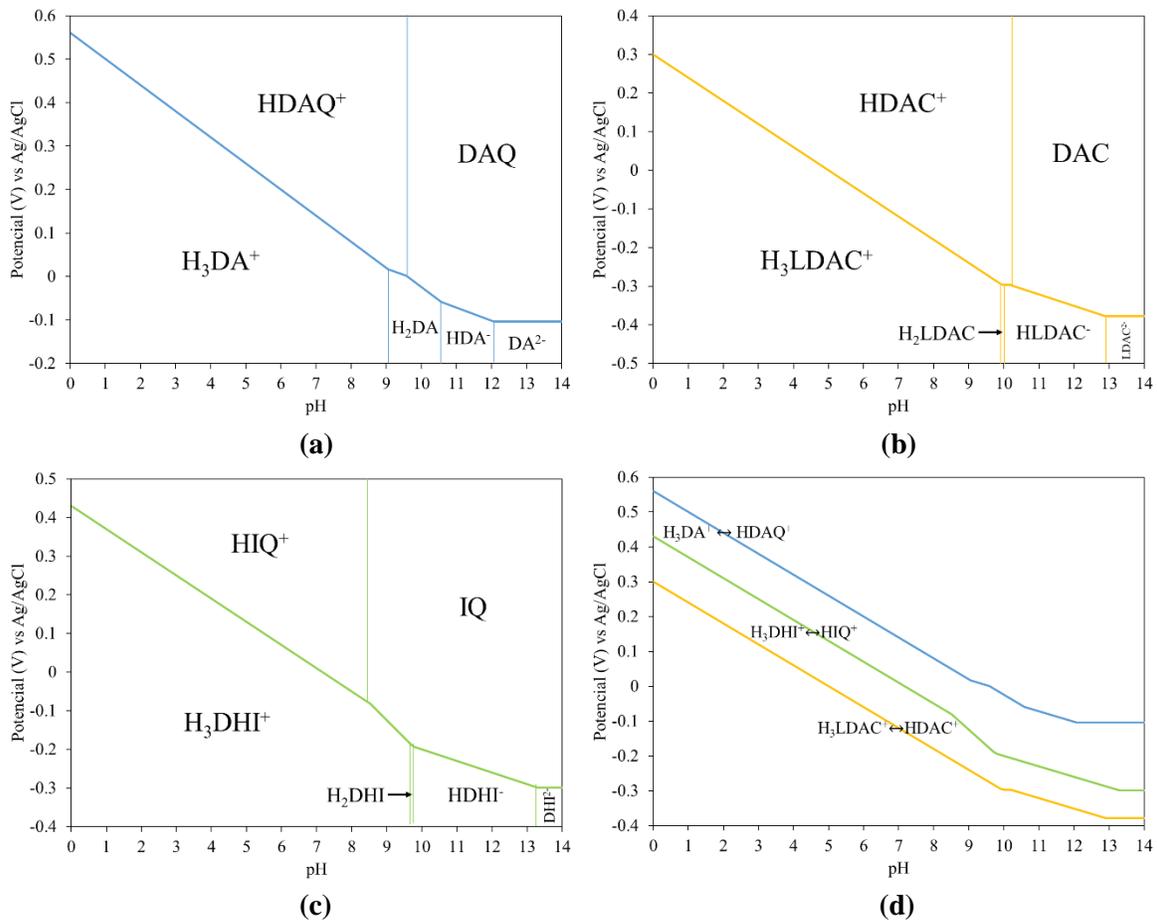


Figura 16: Diagramas tipo Pourbaix E° contra pH. a) Par $\text{HDAQ}^+/\text{H}_3\text{DA}^+$. b) Par $\text{HDAC}^+/\text{H}_3\text{LDAC}^+$. c) Par $\text{HIQ}^+/\text{H}_3\text{DHI}^+$. d) Los diagramas combinados.

Para terminar de identificar las señales que aparecen a potenciales mayores a +0.5 V a $\text{pH} \geq 7$ en los voltamperogramas cíclicos de la H_3DA^+ , las cuales aún no han sido identificadas, pero si reportadas en Li et al. (2019), se realizó un análisis electroquímico de la solución de H_3DA^+ en función del tiempo a pH 6 y 11 por voltamperometría cíclica durante dos ciclos, sin proteger la solución de la luz. En la figura 17 se observan los voltamperogramas cíclicos de la H_3DA^+ con el tiempo. A ambos pH se observan las señales características de la H_3DA^+

en solución descritas con anterioridad. A pH 6 se observa un cambio discreto en los voltamperogramas y no se observó ningún cambio de color en la solución, lo que nos indica la buena estabilidad de tiene la H_3DA^+ a pH ácido como se señala en Sánchez-Rivera et al. (2003). Se siguen observando las cuatro señales características de este pH, las señales III y IV aumentan de intensidad con el tiempo pues se está oxidando y electropolimerizando más H_3DA^+ y desde un inicio aparece una señal cerca de +1.0 V.

Por otro lado, a pH 11 si se observó un cambio en los voltamperogramas y en el color de la solución. Con el paso del tiempo la solución cambio de color amarillo, naranja y finalmente a un café oscuro. En los voltamperogramas cíclicos a pH 11 (Fig. 17b) se observa la disminución de la intensidad de las señales I, III, IV, V y de las señales ubicadas a potenciales mayores a +0.5 V, así como la aparición una señal muy poco intensa cerca de +0.3 V. Esto se atribuye a que la H_3DA^+ se transforma a productos de descomposición no identificados, los cuales parecen presentar un coeficiente de absortividad elevado ya que se observa una transición de color en la solución, de un color translucido a un café oscuro muy intenso. Dichos productos no se pueden detectar por voltamperométrica cíclica, lo que se atribuye, a que se generan en cantidades pequeñas en tiempos cortos o bien debido a que no son electroactivos.

Las señales de óxido-reducción a potenciales mayores a +0.5 V a partir de pH 6, están relacionadas directamente con la oxidación de la H_3DA^+ . Una posible idea para explicar la presencia de las señales a potenciales mayores a +0.5 V es el proceso de óxido-reducción del grupo amino a imino, en alguno de los siguientes compuestos durante la oxidación de la H_3DA^+ : H_3LDAC^+ , $HDAC^+$, H_3DHI^+ , HIQ^+ , ya que poseen un grupo amino secundario ubicado en la posición de un oxígeno en una quinona, el cual se puede oxidar y reducir electroquímicamente (Vivaldi et al. 2020).

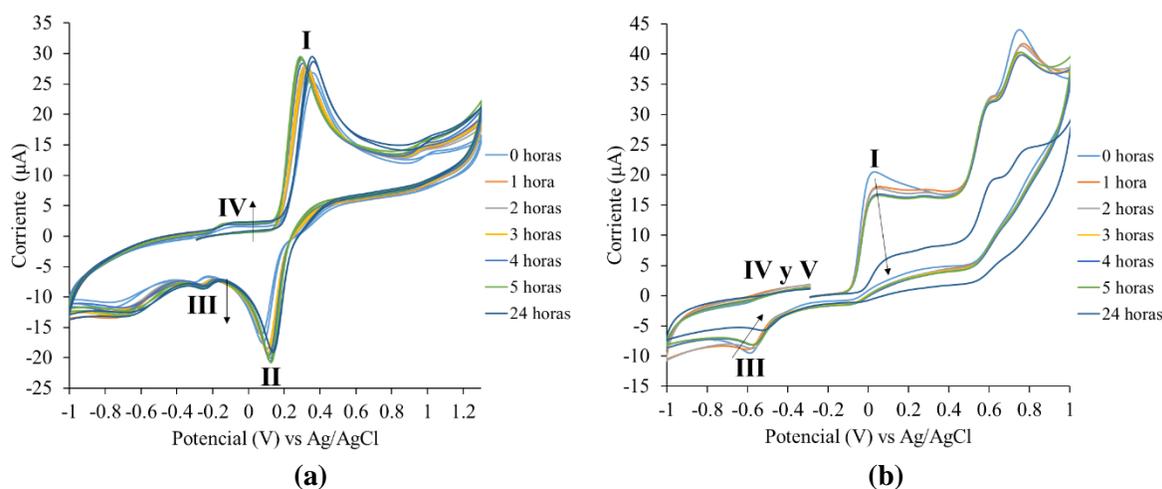


Figura 17: Voltamperogramas cíclicos de la dopamina (H_3DA^+) en solución sin protección de la luz. a) A pH 6. b) A pH 11.

Se eligió a la dopamina (H_3DA^+) para el desarrollo de la plataforma voltamperométrica de pH, debido que posee una mayor sensibilidad de 57.7 mV/pH en la curva de potencial contra pH, en un amplio intervalo de pH de 1 a 13 con buena linealidad ($r^2=0.99$) (Fig. 15) en comparación con el rojo de alizarina que posee una sensibilidad de 52.3 mV/pH en el intervalo de 1 a 13 con una linealidad menor a la de la dopamina ($r^2=0.98$) (Fig. 10). También se eligió a la dopamina pues la polidopamina, polímero derivado de la dopamina, presenta una mayor sensibilidad de 58.2 mV/pH en un intervalo más amplio de 1 a 12 (Amiri et al. 2016) en comparación con el poli-rojo de alizarina S, polímero derivado del rojo de alizarina S, que tiene una sensibilidad de 52.9 mV/pH en un intervalo de 0 a 9 (Grijalva Canales et al. 2022).

5.3 Mecanismo integral de electropolimerización de la dopamina

A partir de nuestros resultados experimentales del análisis en solución de la dopamina y su electropolimerización en condiciones oxigenadas y desoxigenadas, así como de diversos trabajos en la literatura, se propone el siguiente mecanismo integral de electropolimerización de la dopamina (H_3DA^+) basado en un proceso electroquímico-químico-químico-electroquímico-químico-electroquímico-químico (ECCECEC) (E: electroquímico; C: químico) donde todas las especies involucradas se encuentran protonadas al pH de electropolimerización (pH=7) (Fig. 18 y 19): la H_3DA^+ se oxida a $HDAQ^+$, que se desprotona a DAQ , el DAQ se cicla mediante una adición 1,4 de Michael para formar H_3LDAC^+ , el H_3LDAC^+ se oxida a $HDAC^+$, el $HDAC^+$ se isomeriza a H_3DHI^+ , el cual se oxida a HIQ^+ y a partir de la oxidación de H_3DHI^+ a HIQ^+ se forme la polidopamina por medio de un mecanismo de radicales libres donde los radicales se ubican en las posiciones 4 y 7 o 4 y 2 de la HIQ^+ (Fig. 18 y 20), para formar diversas estructuras como se muestra en la figura 22, donde se pueden tener secciones lineales (a), ramificadas (c) o la combinación de ambas (b) (Chen et al. 2017).

Esta propuesta se fundamenta en nuestros resultados experimentales y trabajos reportados que se describen a continuación. Jiang et al. (2022) analizaron la electropolimerización de la dopamina (H_3DA^+) por espectroscopia de masas de reionización neutro-electroquímica (EC-NR-MS) e identificaron que las especies presentes durante este proceso fueron la H_3DA^+ , $HDAQ^+$, H_3LDAC^+ , $HDAC^+$ y H_3DHI^+ . Por otra parte, Zhang et al. (2020b) analizaron la electrooxidación de la dopamina por espectroscopia electroquímica de resonancia magnética nuclear (EC-NMR) y encontraron que las especies presentes durante la electropolimerización de la dopamina fueron H_3DA^+ , $HDAQ^+$, $HDAC^+$ y H_3DHI^+ , cuyas concentraciones dependían del voltaje de oxidación impuesto y del pH, coincidiendo con Jiang et al. (2022) excepto por H_3LDAC^+ . Ismail et al. (2016), con base en sus cálculos químicos cuánticos, confirman la secuencia de reacciones en que se lleva a cabo la electropolimerización de la H_3DA^+ y muestran la importancia de la desprotonación de la amina de la $HDAQ^+$ para que se lleve a cabo la electropolimerización. Chen et al. (2017) igualmente con base en sus cálculos teóricos de teoría de funcionales de la densidad y simulaciones de dinámicas

moleculares, determinaron que las posiciones de los radicales en la HIQ⁺ son más probables en las posiciones 2, 4 y 7, y que partir de estas posiciones se forman los dímeros, trímeros y tetrameros de la polidopamina, donde se prefiere que las unidades de la polidopamina se unan de forma mixta y ramificada (Fig. 21).

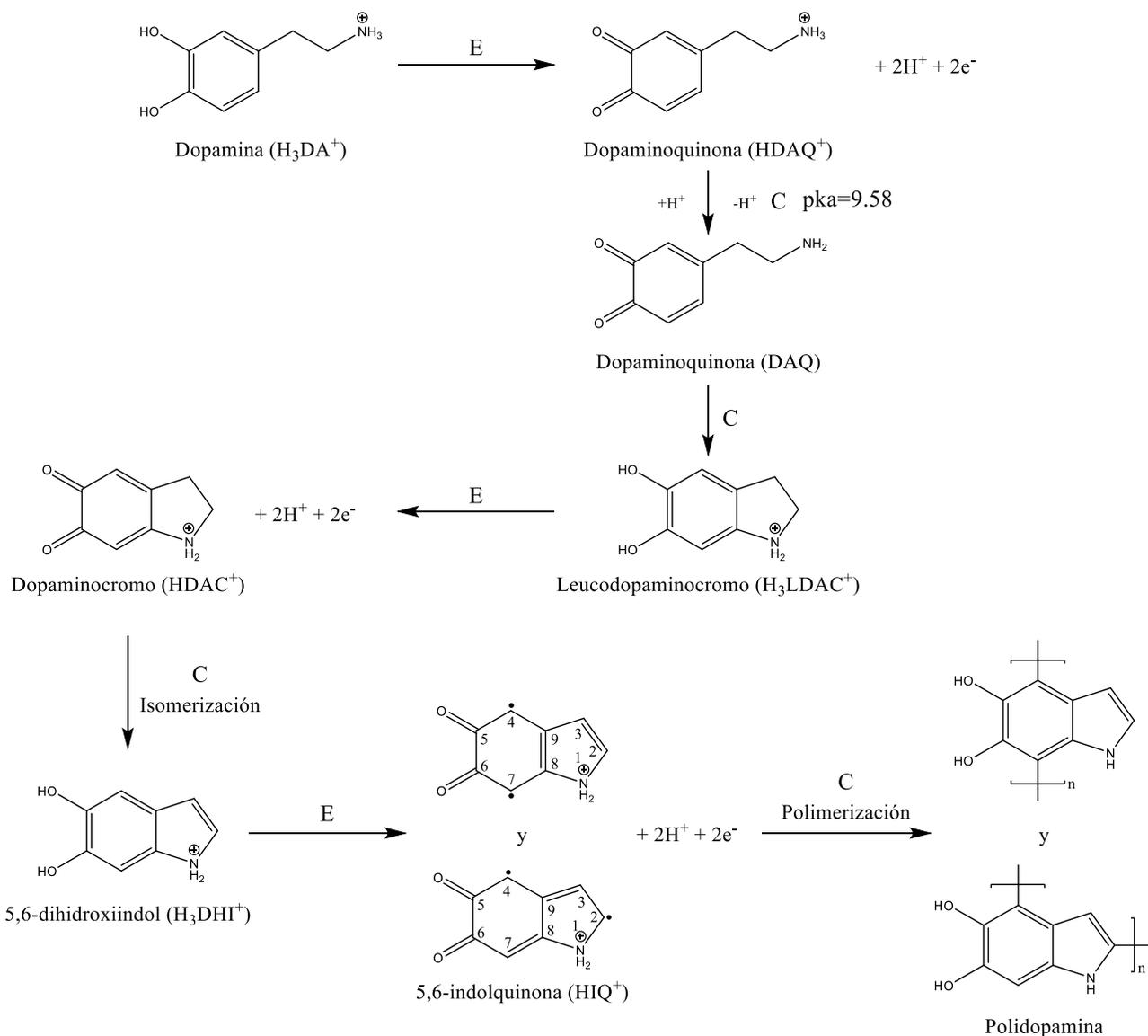


Figura 18: Mecanismo integral propuesto de la electropolimerización de la dopamina (H_3DA^+).

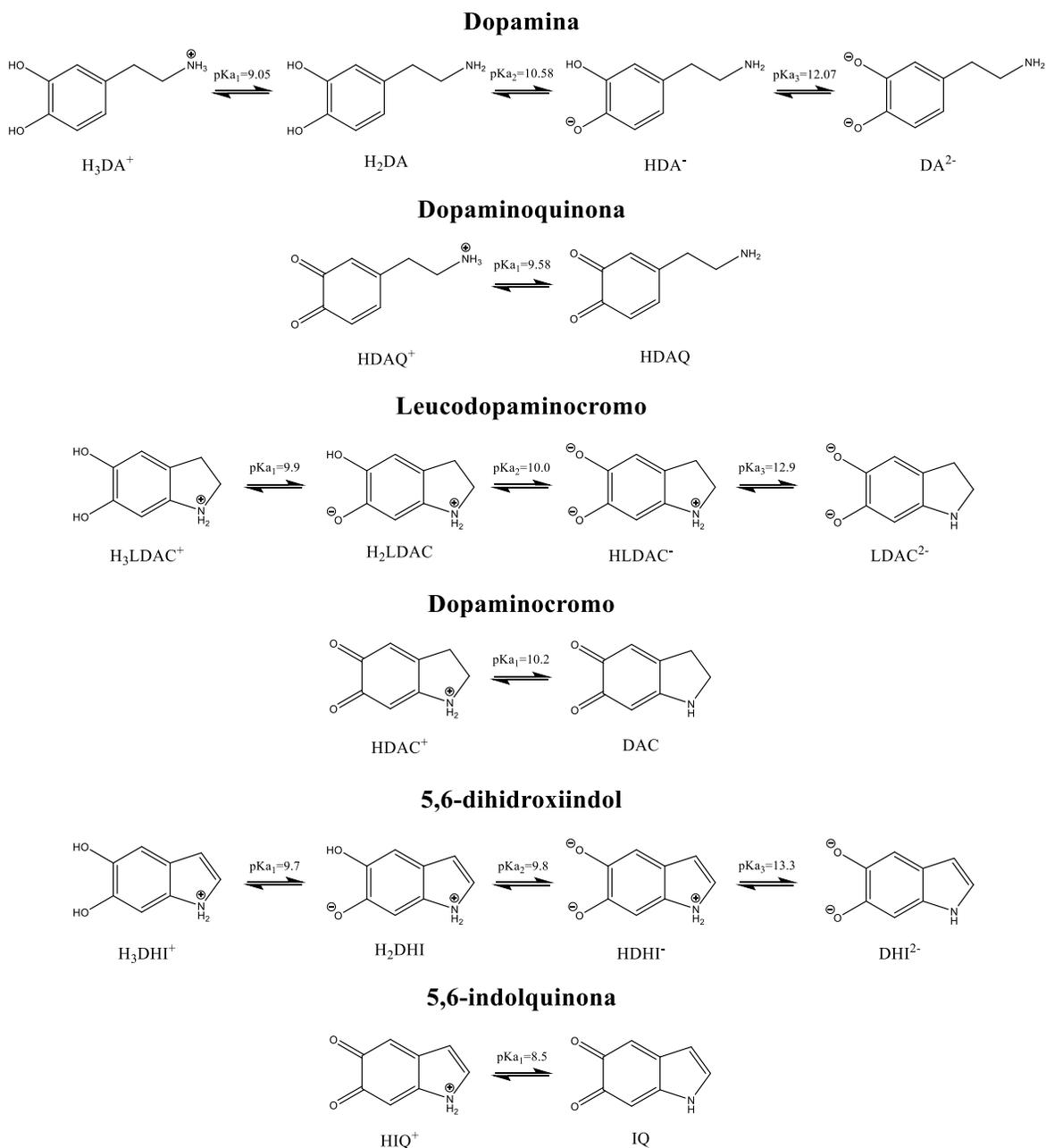


Figura 19: Identidad ácido base de las especies involucradas en la electropolimerización de la dopamina (H_3DA^+).

Debido a que en la literatura no existía ninguna propuesta que mostrara como se lleva a cabo la formación de la polidopamina a partir de un monómero inicial, en la figura 20 se propone un mecanismo de radicales libres para la formación de la polidopamina, donde se plantea que los radicales se forman en los oxígenos de H_3DHI^+ y que el primero se forme en el hidroxilo con menor pka. Se observa que en la iniciación se oxida la molécula y se forma el radical en el hidroxilo con menor pka (recuadro azul), que este radical se deslocaliza en el anillo

aromático pudiendo colocarse en las posiciones 2 y 7 del anillo de indol y que, una vez se oxida el otro hidroxilo, el radical termina en la otra posición posible, la 4 (Chen et al. 2017). Este mecanismo muestra la selectividad que se presenta para la formación de la polidopamina. Finalmente, en la terminación se produce la reducción que regenera la aromaticidad, para dar lugar a la estructura que se propone para la polidopamina a partir de este mecanismo (Fig. 21).

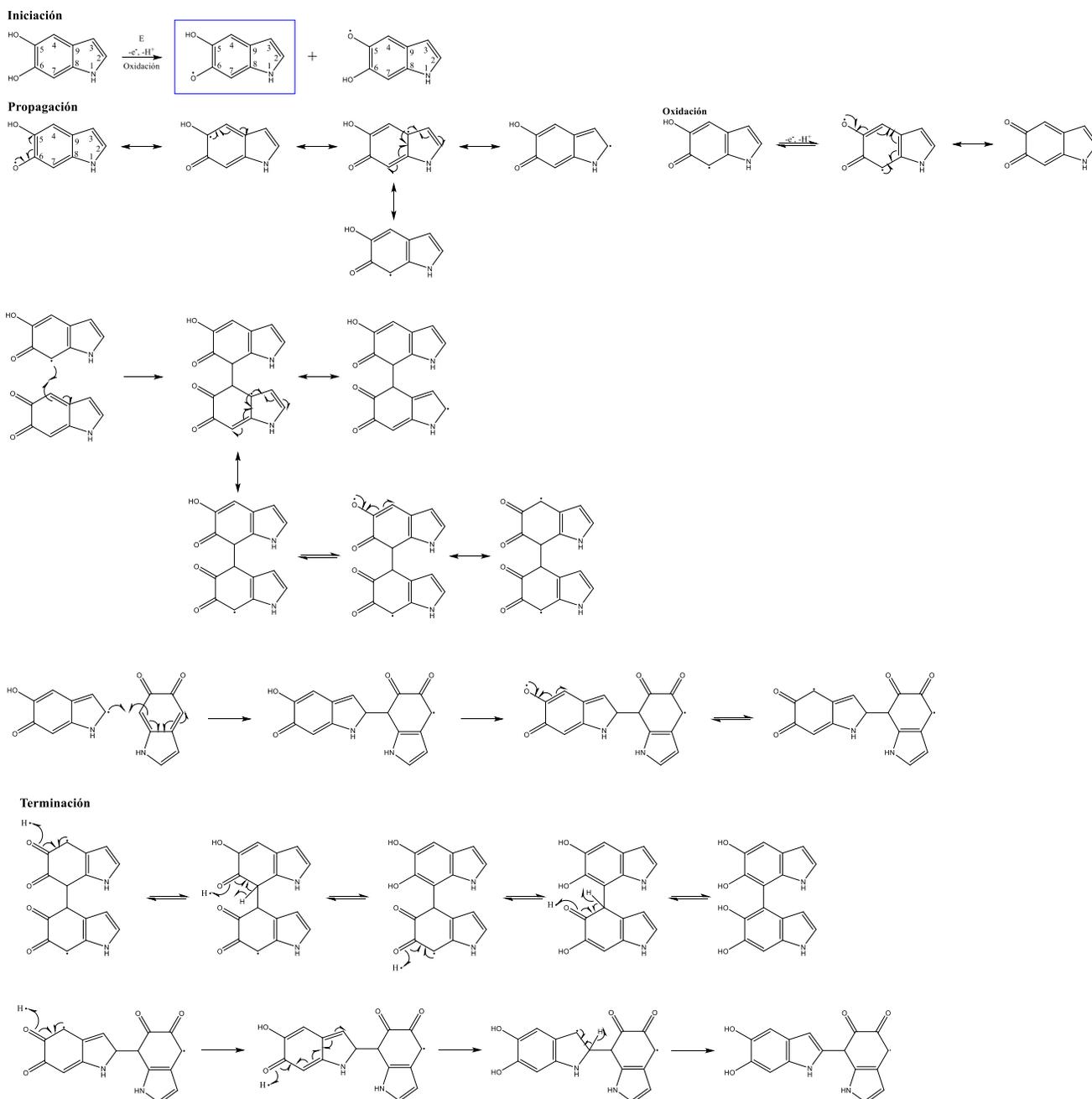


Figura 20: Propuesta de la formación de la polidopamina mediante un mecanismo de radicales libres a partir de la 5,6-indolquinona. Elaboración propia.

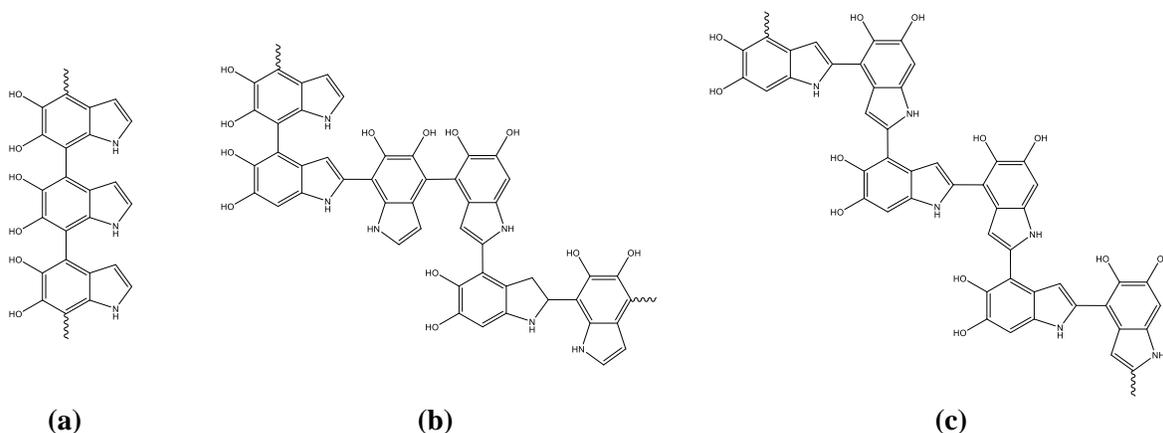


Figura 21: Propuesta de las posibles estructuras de la polidopamina obtenida por electropolimerización. a) Lineal. b) Mixta. c) Ramificada.

En la figura 22 se presentan los voltamperogramas ciclos de electropolimerización de la H_3DA^+ en condiciones sin desoxigenar y desoxigenadas. En ambas condiciones se presentan las mismas señales descritas en el análisis de la H_3DA^+ en solución. Se observa que, en las condiciones desoxigenadas, las intensidades de las señales son mayores que en las condiciones sin desoxigenar y, en ambos casos, que la intensidad de las señales disminuye debido a que la superficie del electrodo se pasiva por la formación de la polidopamina.

La polidopamina electropolimerizada en condiciones desoxigenadas mostró un compartimento electroquímico similar al de la polidopamina preparada en condiciones sin desoxigenar. En ambas condiciones se observó que las señales se desplazan a potenciales menores con el aumento del pH con la diferencia de que la polidopamina en condiciones desoxigenadas presenta más de las tres señales que posee la polidopamina en condiciones sin desoxigenar (ver sección 6.4.1 y Fig. 29). Esto se atribuye a que el oxígeno ya no interfiere con la formación de otras estructuras de la polidopamina que dan origen a la aparición de más señales electroquímicas. Por otro lado, no se observó un incremento significativo en la intensidad de las señales en las condiciones desoxigenadas respecto de las de sin desoxigenar.

Además, cuando se disminuyó el intervalo de electropolimerización a -0.4 a +1.1 V en condiciones sin desoxigenar, se observó el mismo comportamiento electroquímico de la polidopamina, aunque la linealidad disminuyó en la curva de potencial contra pH.

Tomando en consideración que no se obtuvo una mejoría importante en la respuesta de la plataforma en las condiciones desoxigenadas, se decidió continuar con la preparación de la polidopamina en las condiciones sin desoxigenar. Esto representa una gran ventaja ya que es un método más sencillo, asequible, económico y fácil de implementar.

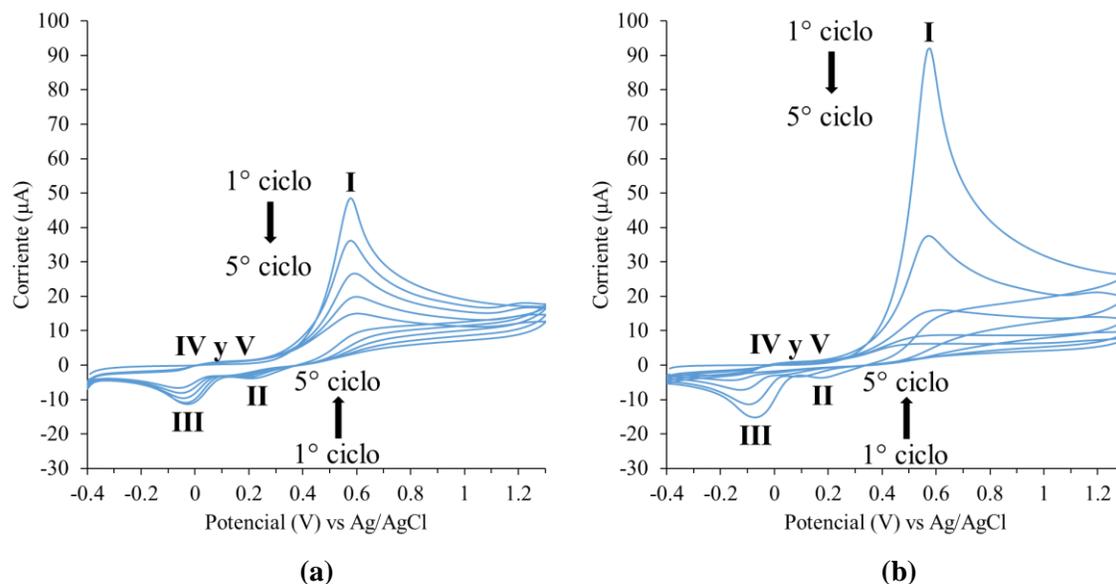


Figura 22: Voltamperogramas cíclicos de la electropolimerización de la dopamina en buffer de fosfatos (PBS) 0.1M pH 7, 5 ciclos, 50 mV/s. a) En condiciones con oxígeno. b) En condiciones desoxigenadas.

Como hemos visto, se evaluó el comportamiento electroquímico del H_2ARS y la H_3DA^+ en solución por CV. Ambas especies presentan cinco señales. La H_3DA^+ en condiciones desoxigenadas presenta el mismo comportamiento electroquímico que en condiciones sin desoxigenar. A partir de este análisis, se obtuvieron los potenciales normales de los pares: TTS/H_2ARS , $HDAQ^+/H_3DA^+$, $HDAC^+/H_3LDAC^+$, HIQ^+/H_3DHI^+ , que fueron usados para construir los respectivos diagramas Pourbaix que confirman el compartimento observado.

A partir de nuestros resultados experimentales y de información reportada en la literatura se propuso un mecanismo integral de electropolimerización de la H_3DA^+ , que va desde la oxidación de H_3DA^+ hasta la formación de la polidopamina, donde la polidopamina se forma por medio de un mecanismo de radicales libres a partir de la HIQ^+ : $H_3DA^+ \xrightarrow{E} HDAQ^+ \xrightarrow{C} DAQ \xrightarrow{C} HLDAC^+ \xrightarrow{E} HDAC^+ \xrightarrow{C} HDHI^+ \xrightarrow{E} HIQ^+ \xrightarrow{C} \text{polidopamina}$. Con este mecanismo se propuso una estructura para la polidopamina obtenida por electropolimerización.

Se eligió a la H_3DA^+ para la construcción de la plataforma voltamperométrica de pH ya que presentaba una mayor sensibilidad en un intervalo de pH más amplio con mejor linealidad que el H_2ARS .

Para la construcción de la plataforma voltamperométrica se decidió electropolimerizar la dopamina en condiciones sin desoxigenar ya que la polidopamina preparada en condiciones desoxigenadas no mostró ninguna mejoría importante que en condiciones sin desoxigenar. Esto representa una ventaja debido a que la construcción de la plataforma se vuelve más sencilla, económica y fácil de realizar.

Capítulo VI: Plataforma voltamperométrica de pH

6.1 Construcción de la plataforma voltamperométrica de pH

Inicialmente, se preparó la plataforma electropolimerizando la H_3DA^+ en las condiciones de Amiri et. al. (2016). En la figura 23a se presentan los voltamperogramas cíclicos durante la electropolimerización de la H_3DA^+ , en el cual se observan las cuatro señales características de la electropolimerización de la dopamina descritas con anterioridad. En la figura 23b se muestran los voltamperogramas cíclicos de la polidopamina depositada en la superficie del electrodo a diferentes pH. Se observan tres señales, dos señales de reducción A y B y una señal de oxidación C. Estas señales se desplazan hacia potenciales menores y su intensidad disminuye con el aumento del pH. Debido a que la señal C es la más intensa de las tres se decidió seguir esta señal para el desarrollo de la plataforma voltamperométrica de pH. En la curva de potencial contra pH de la señal C de la polidopamina (Fig. 23c), se aprecia que la plataforma posee buena linealidad en el intervalo de pH de 1 a 11 y un comportamiento nernstiano de 62.1 mV/pH, el cual sugiere la transferencia de igual número de protones que de electrones, en este caso dos electrones y dos protones, lo que concuerda con lo reportado por Amiri et. al. (2016).

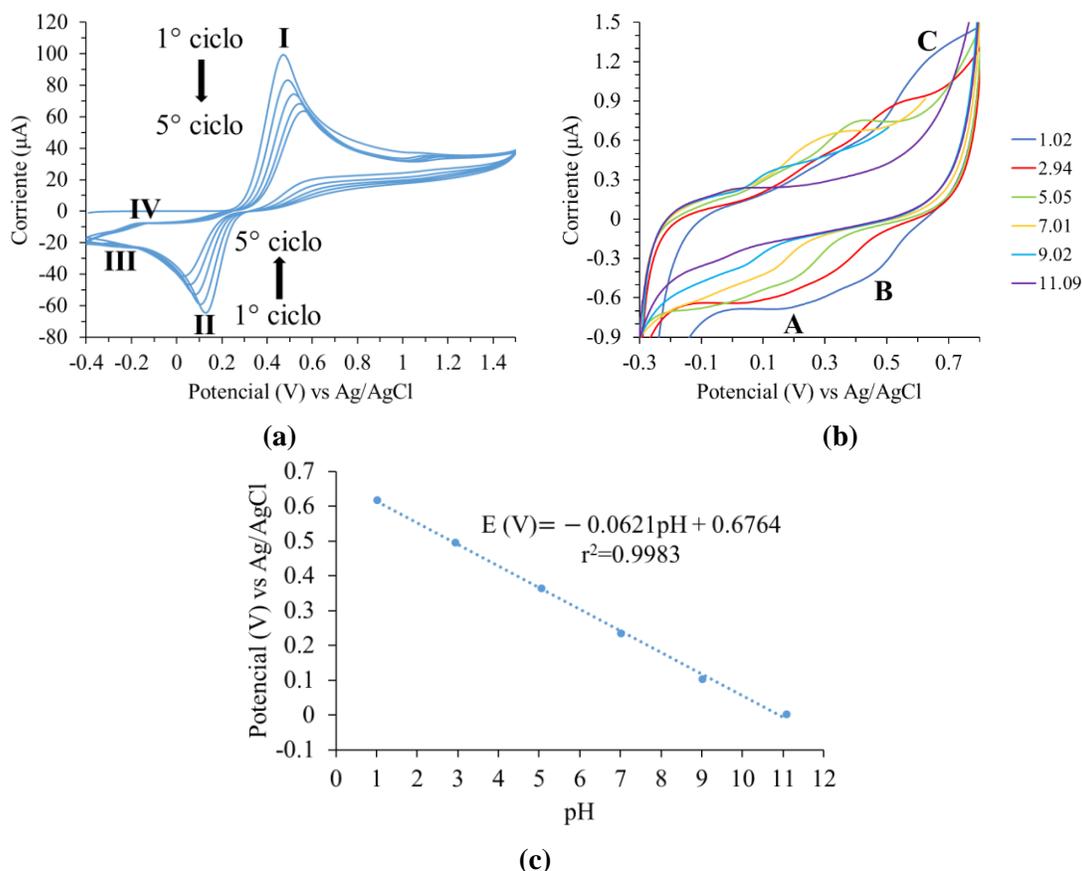


Figura 23: Plataforma voltamperométrica de pH sin Nafion. a) Electropolimerización de la dopamina (H_3DA^+) sobre la superficie de carbón vítreo. b) Voltamperogramas cíclicos de la polidopamina. c) Curva de calibración potencial contra pH a partir de los potenciales de oxidación de la polidopamina.

Como las condiciones de electropolimerización de la dopamina mencionadas con anterioridad no eran las mejores se realizaron los siguientes cambios en las condiciones de electropolimerización:

Primero, debido a que la polidopamina era pobremente retenida sobre la superficie del electrodo de carbón vítreo, lo que ocasiona que el polímero se pierda con facilidad en solución y, por ende, solo pueda ser útil para pocas mediciones de pH, se decidió mejorar su retención mediante el uso de una membrana de Nafion debido a su elevada estabilidad, su baja conductividad eléctrica y su uso exitoso en la modificación para recubrir electrodos (Ma et al. 2009). La plataforma voltamperométrica de pH se preparó con Nafion para aumentar la retención de la polidopamina sobre la superficie del electrodo. Se probaron 5, 7.3 y 10 μL de Nafion al 5%. Se observó que entre mayor era la cantidad de Nafion, se retenía mejor la polidopamina ya que las señales eran más intensas. Por lo que, se decidió emplear 10 μL de Nafion para mejorar la retención de la polidopamina y poder cubrir por completo la superficie del electrodo. Al adicionar la membrana de Nafion a la plataforma, esta obtuvo una mayor estabilidad pues mantuvo a la polidopamina retenida sobre la superficie del electrodo de carbón vítreo por cinco días.

Segundo, se cambió el pH y la identidad del buffer. Se cambió de pH 5 a 7 ya que la electropolimerización de la dopamina se favorece con el aumento del pH (Li et al. 2006), pero no mayor a 7 para que la dopamina se mantuviera estable en solución ya que a pH 7 aún se mantiene totalmente protonada (Sánchez-Rivera et al. 2003). Se cambió la identidad del buffer de acetatos a fosfatos ya que los acetatos inhiben la electropolimerización de la H_3DA^+ (Li et al. 2006) y disminuyen su estabilidad ya que después de aproximadamente 10 minutos la solución se tornaba de un color amarillo rojizo indicando la descomposición de la dopamina, mientras que este cambio de color en el buffer de fosfatos comenzaba a hacerse presente después de varias horas sin la protección de la luz.

Tercero, también se cambiaron las condiciones de medición de la plataforma voltamperométrica de pH. A partir de este punto también se decidió cambiar la técnica de medición de la plataforma voltamperométrica, de voltamperometría cíclica por voltamperometría diferencial de pulsos ya que la última es una técnica con una mayor sensibilidad y una mejor resolución de las señales que la primera (Muguruma et al 2016). También se evaluó el efecto del acondicionamiento de la membrana en la linealidad de la curva de potencial contra pH. Se observó que, a mayor tiempo en contacto con la solución, la plataforma mejora la linealidad: 30 segundos ($r^2=0.97$), 1 minutos ($r^2=0.99$), y 5 minutos ($r^2=0.999$), pero para mantener tiempos de análisis cortos se decidió dejar la plataforma en contacto con la solución un tiempo mínimo de 1 minuto antes de cada medición.

6.2 Plataforma voltamperométrica de pH con Nafion

A partir de la información anteriormente mencionada se preparó la plataforma voltamperométrica de pH de la siguiente manera:

Se depositaron 10 μL de Nafion al 5% sobre la superficie del electrodo de carbón vítreo, se secó a 40 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos y luego se dejó atemperar por cinco minutos. Después, se introdujo el electrodo en una solución 5 mM de dopamina en buffer de fosfatos pH 7 y se realizaron 5 barridos consecutivos por CV en la ventana de potencial -0.4 V a +1.5 V a una velocidad de 50 mV/s, protegiendo la solución de la luz (Fig. 24a). Posteriormente, se analizó la plataforma voltamperométrica de pH por voltamperometría diferencial de pulso (DPV) en la ventana de potencial de -0.3 V a +0.8 V a diferentes valores de pH: 1, 3, 5, 7, y 9 en buffer Britton-Robinson 0.05 M. Antes de cada medición se acondicionó la membrana durante un minuto.

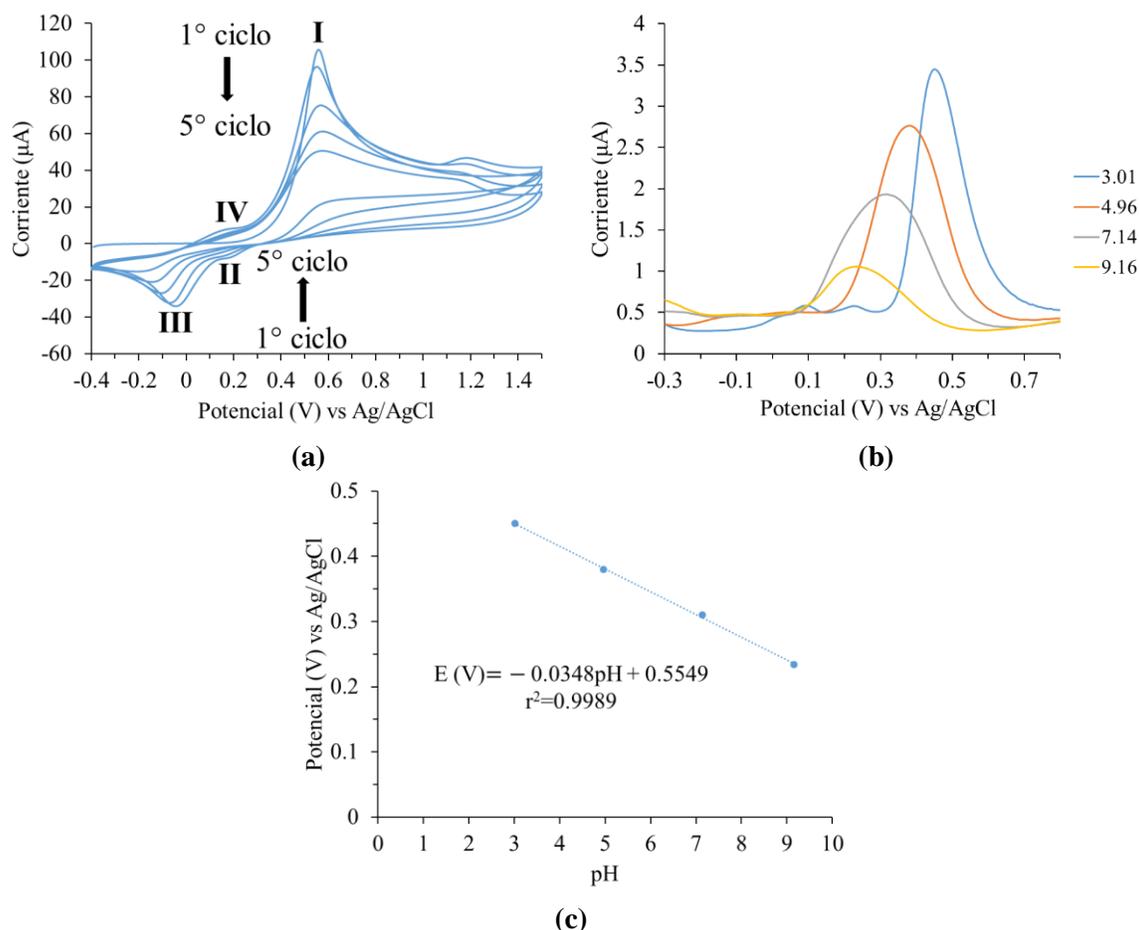


Figura 24: Plataforma voltamperométrica de polidopamina con Nafion. a) Electropolimerización de la dopamina sobre la superficie de carbón vítreo con Nafion. b) Voltamperogramas diferenciales de pulso de la polidopamina. c) Curva de calibrado potencial contra pH.

La plataforma voltamperométrica de pH con Nafion se presenta en la figura 24. Los voltamperogramas diferenciales de pulso (Fig. 24b) muestran que las señales de la polidopamina se desplazan hacia potenciales menores y disminuye su intensidad de corriente con el aumento de pH. A partir de los potenciales de oxidación de la polidopamina se construyó la curva de calibración potencial contra pH (Fig. 24c), en la cual se observa una buena linealidad en el intervalo de pH de 3 a 9 con una sensibilidad de 34.4 mV/pH. Igualmente, en los voltamperogramas diferenciales de pulso se observan tres señales que se describirán con más detalle en la sección 6.4.1.

6.3 Optimización de la plataforma voltamperométrica de pH

Debido a que la sensibilidad de la plataforma voltamperométrica de pH era baja en la curva de potencial contra pH, se buscó maximizarla por medio de un diseño de experimentos Taguchi L₉ de tres factores a tres niveles (Tabla 7). En la tabla 7 se muestra el diseño experimental y la respuesta obtenida por cada experimento. Las condiciones óptimas para obtener la máxima sensibilidad fueron los niveles más bajos de cada factor, una concentración de dopamina de 5 mM, cinco ciclos y un intervalo de electropolimerización de -0.4 V a +1.3 V. Se observó que a menor cantidad de ciclos la sensibilidad aumenta, mientras que el aumento en la concentración de dopamina aumenta la intensidad de las señales, pero disminuye el valor de la sensibilidad. Esto se atribuye a que con una menor concentración de dopamina y un menor número de ciclos se forma una capa de polidopamina más delgada, lo que permite una mejor oxidación de la polidopamina. El factor que más afecta la sensibilidad es el número de ciclos de electropolimerización (Fig. 25).

Tabla 7: Resultados del diseño de experimentos Taguchi L₉ (3³) para optimización de la plataforma voltamperométrica de pH.

Experimento	Factores			Respuesta
	A: Concentración de dopamina (mM)	B: Número de ciclos	C: Intervalo de potencial	Sensibilidad (mV/pH)
2	5	5	-0.4 a + 1.3V	47.7
4	5	10	-0.4 a + 1.4V	36.0
8	5	15	-0.4 a + 1.5V	45.8
5	7.5	5	-0.4 a + 1.4V	46.8
9	7.5	10	-0.4 a + 1.5V	31.5
7	7.5	15	-0.4 a + 1.3V	36.5
1	10	5	-0.4 a + 1.5V	39.0
6	10	10	-0.4 a + 1.3V	36.7
3	10	15	-0.4 a + 1.4V	37.2

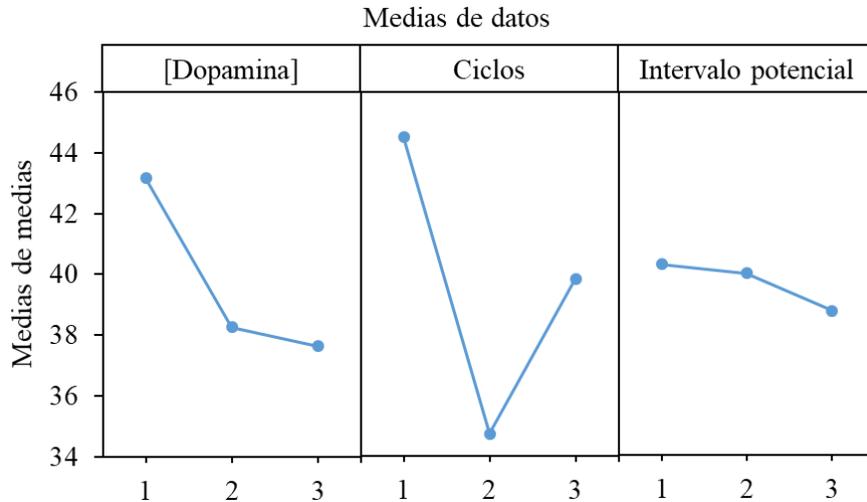


Figura 25: Efectos principales para medias del diseño Taguchi $L_9 (3^3)$ para la optimización de la plataforma voltamperométrica de pH.

En las condiciones óptimas, el sensor exhibe una mayor sensibilidad, mientras que se mantiene la buena linealidad y el comportamiento de los potenciales en función del pH como se observa en la figura 26.

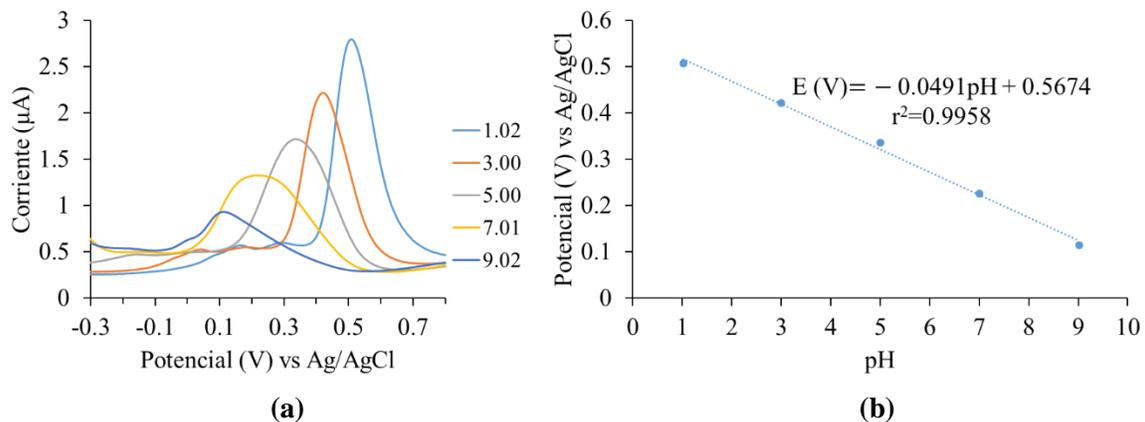


Figura 26: Comportamiento electroquímico de la polidopamina. a) Voltamperogramas diferenciales de pulso de la polidopamina a diferentes pH. b) Curva de calibración potencial contra pH para la polidopamina.

En la figura 27a se presentan los voltamperogramas cíclicos de la plataforma voltamperométrica de pH construida en las condiciones óptimas. Al igual que antes de optimizar, se observan las señales A, B y C, las cuales se desplazan hacia potenciales menores y su intensidad disminuye con el aumento del pH. En la figura 27b se muestra la curva de

calibración potencial contra pH para la señal C, en la cual se observa una pendiente nernstiana en un amplio intervalo de pH de 1 a 13 con buena linealidad. A partir de estos voltamperogramas cíclicos se obtuvo un valor de potencial normal para la polidopamina de 0.380 ± 0.035 V (vs Ag/AgCl).

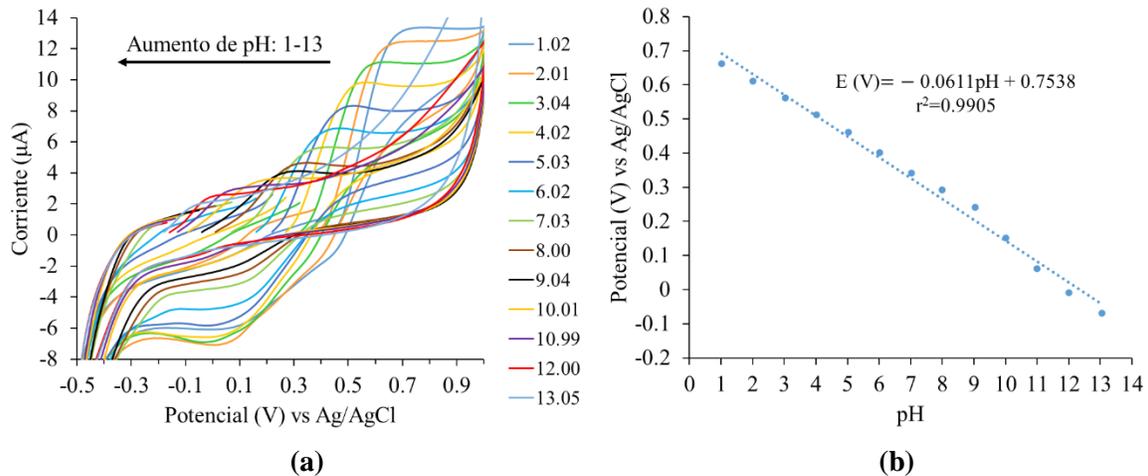


Figura 27: Comportamiento electroquímico de la polidopamina. a) Voltamperogramas diferenciales de pulso de la polidopamina a diferentes pH. b) Curva de calibración potencial contra pH para la polidopamina.

En la figura 28 se presenta la plataforma voltamperométrica de pH construida en las condiciones óptimas y su análisis a lo largo de la escala de pH para determinar el intervalo lineal en el que es funcional. En la figura 28a se muestran los voltamperogramas cíclicos de la electropolimerización de la dopamina, en los cuales, se observan sus cuatro señales características. En la figura 28b se presentan los voltamperogramas diferenciales de pulso de la polidopamina en función del pH. Se observa que la señal C se desplaza hacia potenciales menores y su intensidad disminuye con el aumento del pH. En la figura 28c se observa que la plataforma posee una excelente sensibilidad en un amplio intervalo de pH de 0.5 a 13 con buena linealidad.

La plataforma voltamperométrica de pH presenta un comportamiento nernstiano de 61.0 mV/pH \pm 1.6 mV/pH, con buena linealidad en un amplio intervalo lineal de pH de 0.5 a 13. Posee una excelente repetitividad y reproducibilidad y una elevada estabilidad (Tabla 8).

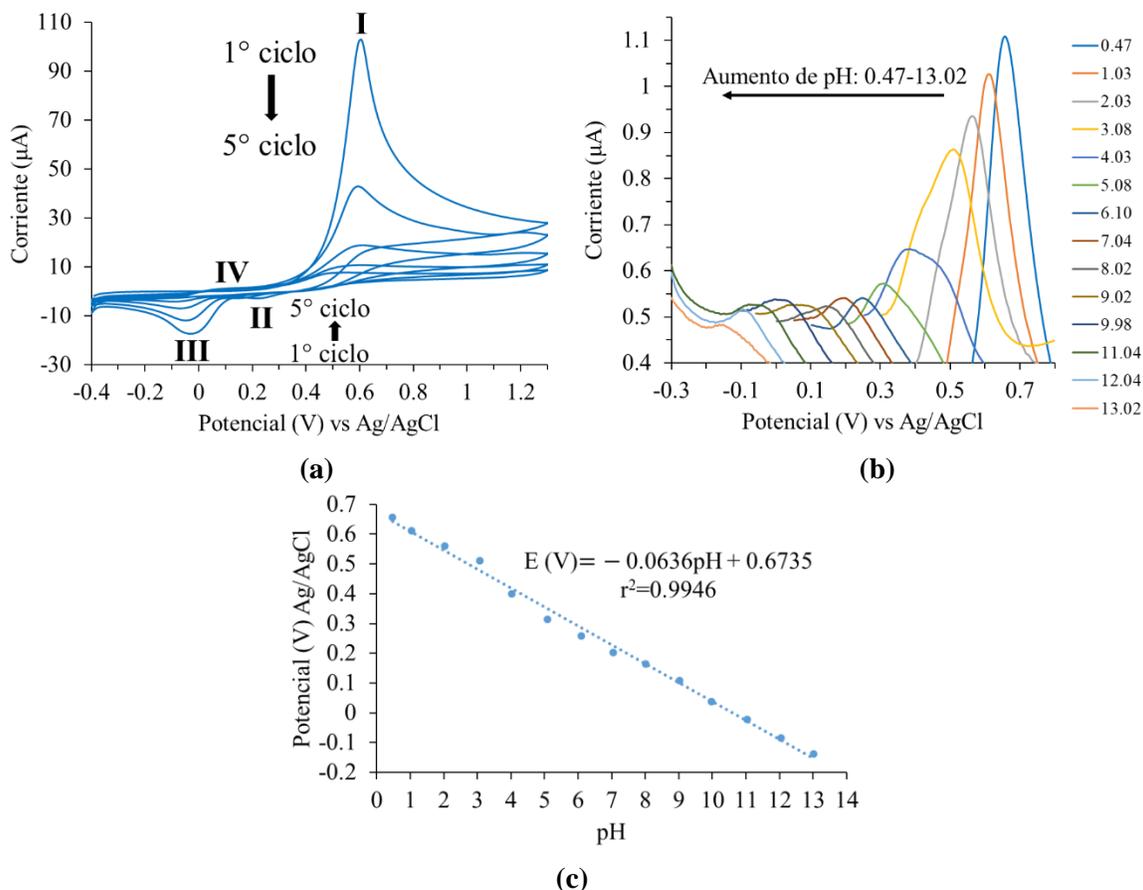


Figura 28: Plataforma voltamperométrica de pH de polidopamina con Nafion en las condiciones óptimas. a) Electropolimerización de la dopamina sobre la superficie de carbón vítreo con Nafion en condiciones optimizadas. b) Voltamperogramas diferenciales de pulso de la polidopamina a diferentes valores de pH. c) Curva de calibración potencial contra pH a partir de los potenciales de oxidación de la polidopamina.

Tabla 8: Parámetros analíticos de la plataforma voltamperométrica de pH.

Sensibilidad	61.0 mV/pH \pm 1.6 mV/pH
Intervalo lineal	pH de 0.5 a 13
Repetitividad (3 dispositivos diferentes, mismo día)	RSD de 1.90% (60.8 \pm 1.2 mV/pH)
Reproducibilidad (3 dispositivos diferentes, diferentes días)	RSD de 3.78% (61.2 \pm 2.3 mV/pH)
Repetitividad (3 curvas un mismo día; mismo dispositivo).	RSD de 3.35% (61.9 \pm 2.1 mV/pH)
Reproducibilidad (curvas en 3 diferentes días; mismo dispositivo)	RSD de 4.02% (63.4 \pm 4.0 mV/pH)
Reproducibilidad en el proceso de construcción (15 dispositivos diferentes)	RSD de 3.35% (61.1 \pm 2.0 mV/pH)

Algo importante de mencionar, es que los valores de la sensibilidad de los 15 dispositivos (Tabla 8) fueron obtenidos de diferentes plataformas, las cuales fueron evaluadas con diferentes números de puntos en diferentes intervalos de pH, y nos confirma la buena reproducibilidad que posee la plataforma.

Se obtuvo una excelente estabilidad de la plataforma voltamperométrica en almacenamiento ya que después de 26 días sin uso la plataforma mantuvo su respuesta analítica para la medición de pH. Un análisis estadístico de comparación de medias *t* de student ($p \leq 0.05$) de la sensibilidad del día cero (45.8 ± 1.3 mV/pH) y del día 26 (46.6 ± 1.2 mV/pH) mostró que las sensibilidades son estadísticamente equivalentes, por lo que se concluye que después de un largo periodo de tiempo en almacenamiento, la plataforma sigue siendo útil para la medición del pH. El valor subnernstiano de las pendientes se atribuye a un efecto memoria que presenta el dispositivo debido a que se requiere que el pH dentro de la membrana se equilibre o iguale con el pH de la solución. Entonces, como las curvas de calibrado se realizaron únicamente con tres puntos (pH 1, 5 y 9) para asegurar el funcionamiento del dispositivo durante todo el análisis, el tiempo de acondicionamiento que se le dio al sensor no fue suficiente para equilibrar el pH de la membrana pues en cambios grandes de pH (4 a 5 unidades de pH) se observa que el dispositivo requiere de un tiempo mayor de acondicionamiento. También se observó que después del tiempo en almacenamiento, la intensidad de las señales disminuyó considerablemente, más del 95% de las señales originales, como en Vivaldi et al. (2020), lo que se atribuye a una encapsulación deficiente de la especie redox (Vivaldi et al. 2020).

6.4 Caracterización de la plataforma voltamperométrica de pH

6.4.1 Caracterización electroquímica de la plataforma voltamperométrica de pH

Como se mencionó anteriormente, la polidopamina presenta tres señales electroquímicas, dos de reducción A y B y una de oxidación C (Fig. 29). Las tres señales son dependientes de pH, se desplazan a potenciales menores con el aumento del pH. Por voltamperometría cíclica las señales A y B se muestran más definidas a pH 7, mientras que las tres señales se separan mejor por voltamperometría diferencial de pulso.

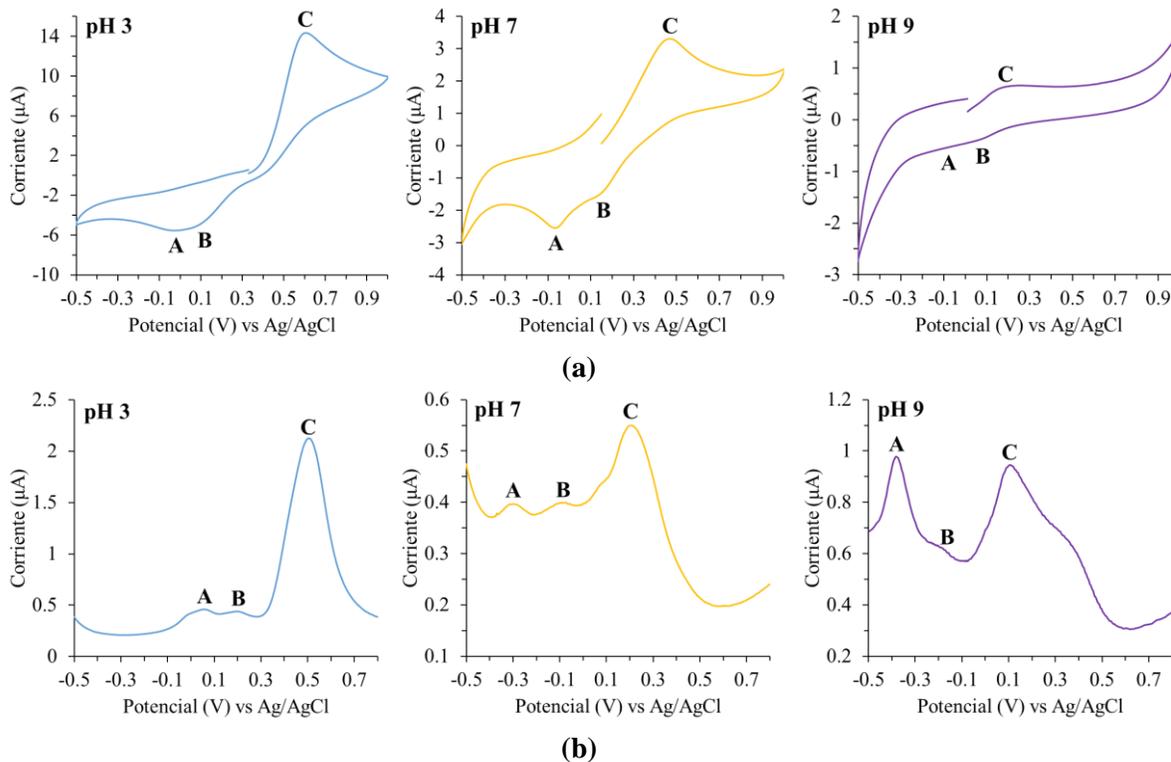


Figura 29: Señales electroquímicas de la polidopamina. a) Por voltamperometría cíclica. b) Por voltamperometría diferencial de pulso.

En la figura 30 se observa que las señales de la polidopamina (A, B y C) son sensibles al pH en un amplio intervalo de 1 a 13. Se observan como los potenciales máximos se desplazan a potenciales menores con el aumento del pH. En las curvas de potencial contra pH, cada una de las señales posee una pendiente nernstiana con buena linealidad en un amplio intervalo de pH de 1 a hasta 13, lo que indica que en cada proceso está involucrado un mismo número de protones que de electrones.

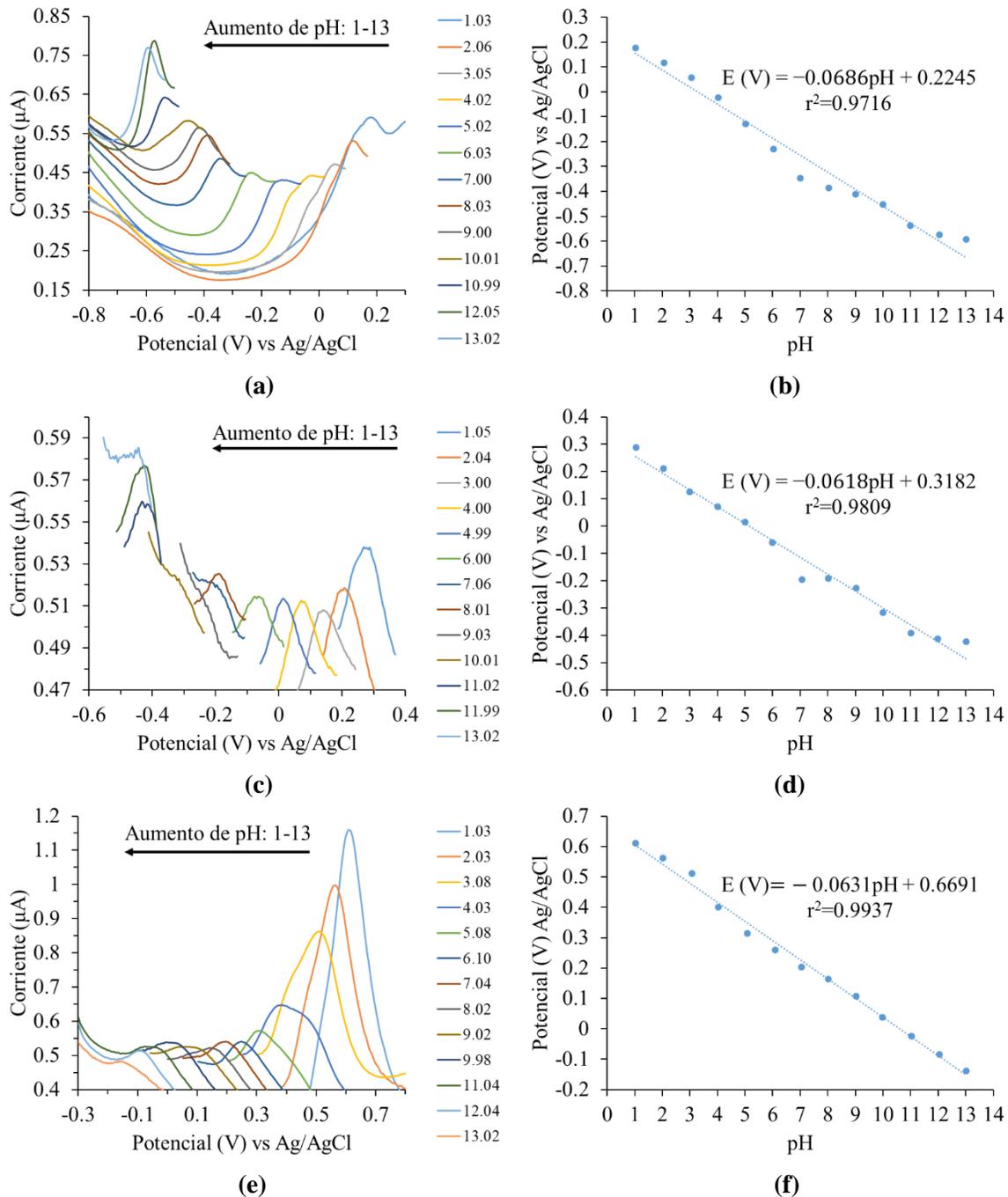


Figura 30: Voltamperogramas diferenciales de pulso de las señales de la polidopamina y su respectiva curva de potencial contra pH (se muestra únicamente los picos máximos de las señales para mejor claridad). A) Voltamperogramas diferenciales de pulso de la señal A. b) Curva de calibración potencial contra pH a partir de los potenciales de la señal A. c) Voltamperogramas diferenciales de pulso de la señal B. d) Curva de calibración potencial contra pH a partir de los potenciales de la señal B. e) Voltamperogramas diferenciales de pulso de la señal C. f). Curva de calibración potencial contra pH a partir de los potenciales de la señal C.

Para determinar si el proceso de óxido-reducción de la polidopamina es químicamente reversible. La polidopamina se sometió a un proceso de oxidación y reducción electroquímica. Como se observa en la figura 31, una vez que se oxida electroquímicamente a la polidopamina durante 20 minutos a +1 V y se barre hacia oxidación (Fig. 31a) se observa como la señal C desaparece en el primer ciclo y una vez que se reduce esta vuelve a estar presente. De igual manera, una vez que la polidopamina se reduce electroquímicamente a +0.5 V durante 20 minutos y se barre a potenciales de reducción no se observan las señales A y B, pero al oxidarse aparece solo una señal de reducción (Fig. 31b). A partir de esto se concluye que el proceso de óxido-reducción de la polidopamina es químicamente reversible, es decir, si se oxida se puede reducir y viceversa. En la sección 6.4.3 se presenta la caracterización de este proceso por espectroscopia de infrarrojo.

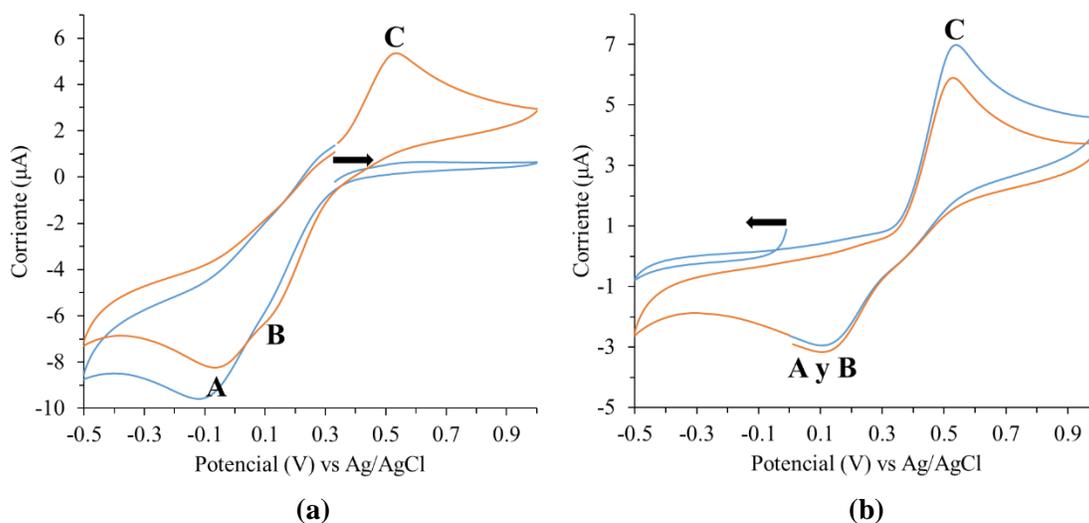


Figura 31: Identificación de señales por voltamperometría cíclica (CV) (azul: primer ciclo; naranja: segundo ciclo) y diferencial de pulsos (DPV). a) Después de oxidación. b) Después de reducción.

Con toda la información anteriormente mencionada se concluye que las señales A y B de la polidopamina son señales de reducción y la señal C de oxidación, todas presentan un comportamiento nernstiano en un amplio intervalo de pH de 1 a 13 con buena linealidad, que en este caso corresponden a las reacciones de óxido-reducción mostradas en la figura 32, donde se transfieren dos protones y dos electrones por unidad de dopamina en la polidopamina. En este punto, se propone que la aparición de las señales A y B, que luego solo se observan en una sola señal, se debe a las condiciones experimentales de medición, que permiten observar las señales A y B de manera separada. También que la señales A y B se deben a que las unidades de dopamina se encuentran unidas de dos maneras diferentes (como se propuso en la sección 5.3), lo que produce que aparezcan dos señales. Entonces en la señal C se debe a la oxidación de las unidades de dopamina en la polidopamina sin importar

su forma de unión, mientras que la señal A y B se deben a la reducción de las unidades de dopamina que se unen de dos formas diferentes, una señal por cada tipo de unión. En la reacción de óxido-reducción de las unidades de dopamina en la polidopamina, sin importar su ambiente químico, están involucrados dos protones y dos electrones (Fig. 32).

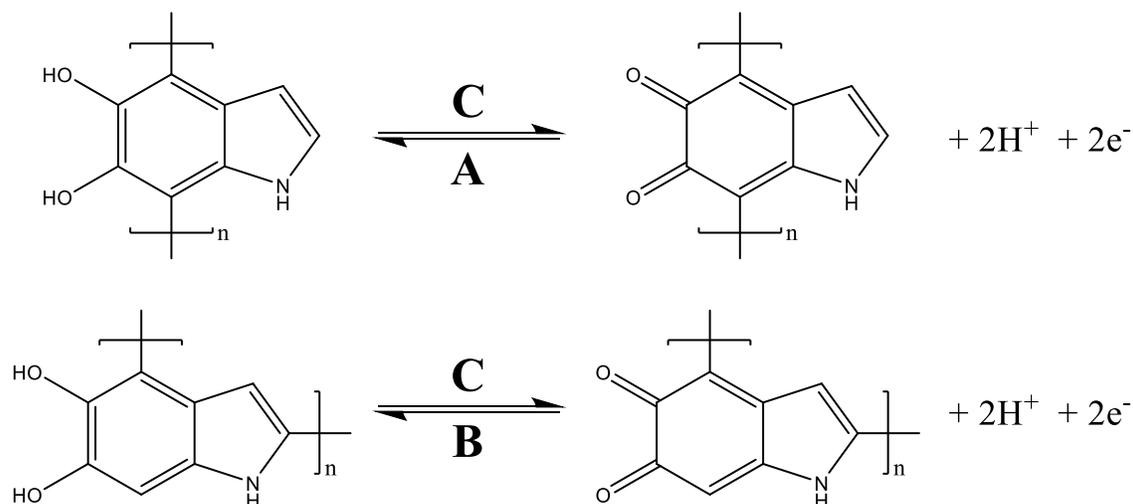


Figura 32: Reacciones de óxido-reducción de la polidopamina.

El análisis de histéresis mostró que los potenciales a pH 3 de la señal C medidos por triplicado antes (480 ± 5 mV) y después de medir pH 7 (460 ± 5 mV) son estadísticamente diferentes (t student comparación de medias $p \leq 0.05$). Sin embargo, es necesario notar que la diferencia entre las medias fue de 20 mV, lo que indica que realmente el potencial no cambia de manera importante. Mientras que para la señal A igualmente la comparación de medias (t student, $p \leq 0.05$), antes (27 ± 5 mV) y después de medir pH 7 (39 ± 3 mV), indicó que son estadísticamente diferentes pero la diferencia entre las medias fue de 12 mV, menor a la de la señal C. Considerando esto, la señal A se eligió para el desarrollo de los biosensores.

En la figura 33 se presenta la estabilidad del potencial en función del número de mediciones. Se observa que los potenciales de la señal C son más estables en pH ácido. El potencial a pH 3 tuvo una RDS% de 2.94%, pH 7 de 20% y pH 11 de 54.3%. Con el número de mediciones la intensidad de las señales disminuyó considerablemente, a pH 3 la señal disminuyó un 95%, a pH 7 un 85%, a pH 11 un 98% después de 50 mediciones sucesivas. Se observa que los potenciales de la señal C requieren de varias mediciones para que el potencial se estabilice. Se observa que la señal A a pH 7 es la más estable de todas con un RDS% de 2.03% después de 50 mediciones, pero durante las primeras 10 mediciones tiene un RDS de 0.46%, lo que indica que el potencial es muy estable. Además, tuvo una disminución de la intensidad de señal de un 90%.

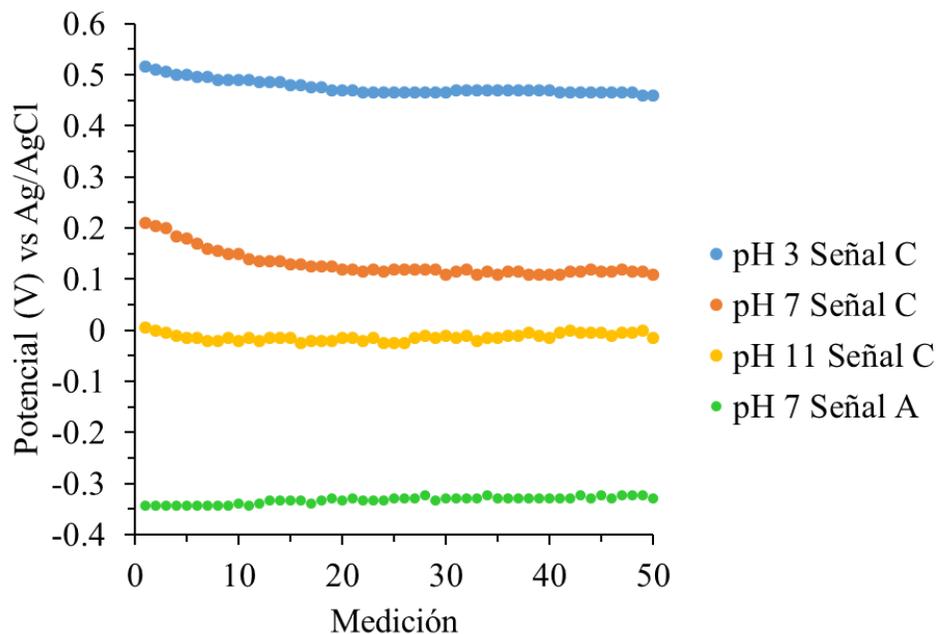


Figura 33: Estabilidad del potencial de la plataforma voltamperométrica de pH.

A partir de lo visto con anterioridad relacionado con la señal A y a que su potencial a pH 7 se encuentra cercano a 7, se decidió emplear esta señal para el desarrollo de los biosensores que se mostrarán en las secciones siguientes.

Las señales de la plataforma voltamperométrica de pH (polidopamina) se pueden recuperar después de que han disminuido considerablemente debido al proceso de medición, para ello se debe de oxidar o reducir la polidopamina electroquímicamente durante un cierto periodo de tiempo, unos pocos minutos dependiendo de la señal que se esté ocupando. Si es la de oxidación se debe de reducir y si es una de reducción se debe de oxidar.

Durante la caracterización de la reversibilidad del proceso de óxido-reducción de la polidopamina (Fig. 31) después de la oxidación y perder completamente la señal C (de oxidación), esta se recuperó un 40% de la señal original al realizar el primer ciclo y ver la señal de reducción. Mientras que para la señal A y B (de reducción) después de perderlas completamente por la reducción se recuperaron un 70% de la señal original, al realizar el primer ciclo y ver la señal de oxidación. Es importante notar que estos ciclos duran aproximadamente un minuto por lo que para recuperar la señal no se requiere de un tiempo largo. Cuando se realizaron 10 mediciones sucesivas a pH 3 por DPV y se redujo la polidopamina durante 10 minutos para recuperar la señal de oxidación, la señal se recuperó un 15%. Esto se debe a que como el barrido por DPV es lento durante el barrido ya se está oxidando la polidopamina lo que no permite ver más intensa la señal recuperada. Esta idea para la recuperación de las señales de la polidopamina se empleó para el funcionamiento del biosensor.

Durante la realización de la caracterización electroquímica de la plataforma voltamperométrica de pH de la polidopamina se observó que la polidopamina se puede usar también para el desarrollo de un sensor potenciométrico de pH, ya que cuando se construyó la curva de calibración potencial contra pH a partir del potencial de corriente nula de la polidopamina a diferentes valores de pH se obtuvo un comportamiento nernstiano de 54.8 mV/pH con buena linealidad en el intervalo de 1 a 13 de pH (Fig. 34).

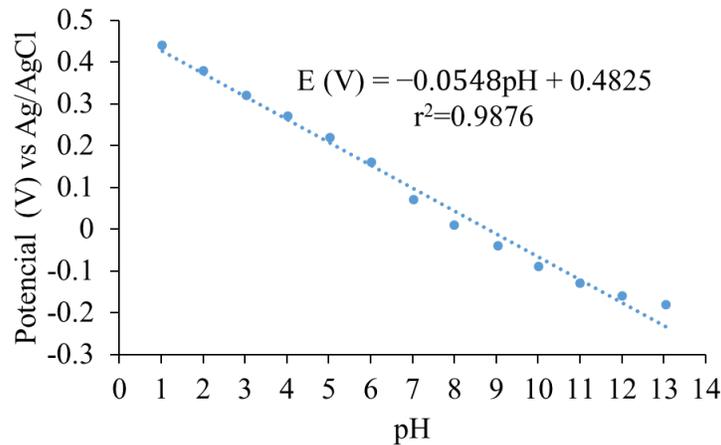


Figura 34: Curva de calibración potencial contra pH a partir del potencial de corriente nula de la plataforma voltamperométrica.

En la figura 35 se presenta el estudio de impedancia de la plataforma voltamperométrica, donde se puede observar el comportamiento de cada una de las modificaciones que se le realizaron al electrodo de carbón vítreo para la construcción de la plataforma. El carbón vítreo tuvo una resistencia de 150.8 Ω , mientras que su modificación con la membrana de Nafion tuvo una resistencia de 160.7 Ω . De esto, se puede notar que la membrana de Nafion hizo al dispositivo más resistivo, tal como se ha reportado previamente en Zhao et al. (2011) y Li et al. (2016), pues es muy poco conductora (Affoune et al. 2005; Napoli et al. 2014), pero no se observa un gran cambio en la resistividad, lo que nos habla de que el Nafion no tiene un efecto importante sobre la conductividad del dispositivo. Una vez que se añade la polidopamina, la resistencia del dispositivo disminuye a 151.5 Ω , de tal manera que se recupera casi completamente la conductividad del carbón vítreo. Esto se puede atribuir a que la polidopamina posee cierta conductividad eléctrica, mayor a la de Nafion y cercana a la del carbón vítreo.

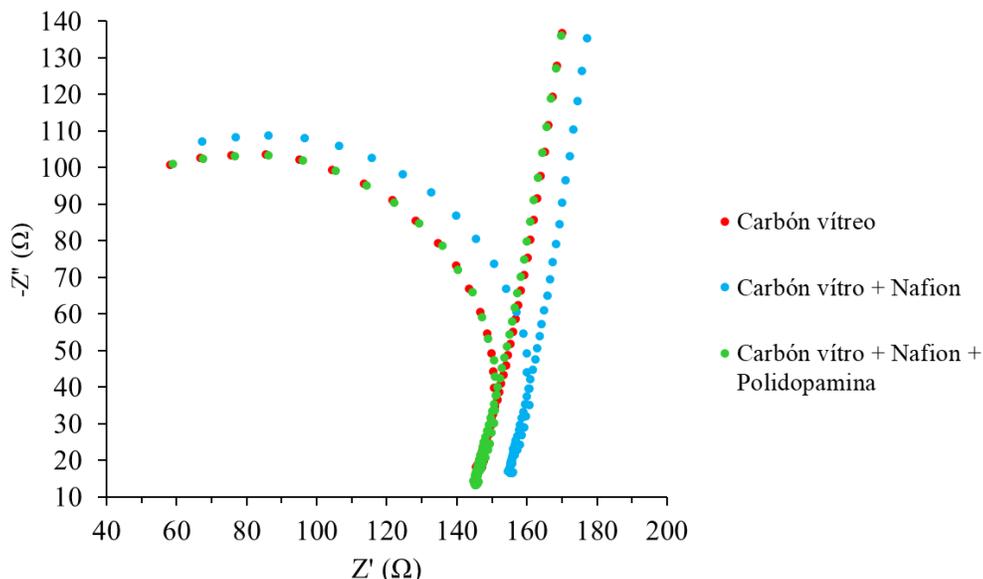


Figura 35: Impedancia electroquímica: Diagrama de Nyquist para la plataforma voltamperométrica, en el intervalo de frecuencias de 1 MHz a 1 KHz en solución 5 mM de $K_4[Fe(CN)_6]$, 5 mM de $K_3[Fe(CN)_6]$ y 0.05 M de KCl.

6.4.2 Caracterización de la plataforma voltamperométrica de pH por microscopia

En la figura 36 se presenta la caracterización óptica de la plataforma voltamperométrica. En las figuras 36a y 36b se observa el electrodo de carbón vítreo limpio con un acabado espejo y, la membrana de Nafion translúcida, que cubre completamente el área del carbón vítreo y presenta una superficie bastante heterogénea como se reporta en Affoune et al. (2005) y O’Dea et al. (2013); asimismo, una vez que se añade la polidopamina, se observa un cambio de color sobre la superficie del carbón vítreo relacionado con la presencia de la polidopamina. Por otra parte, a 400x, no se observa diferencia de distribución del material modificante entre el electrodo con Nafion y el electrodo con Nafion con polidopamina (Fig. 36c), lo que se atribuye a que la dopamina, debido a la membrana de Nafion, solo puede aproximarse al electrodo desde una dirección; caso contrario de los electrodos de carbón vítreo sin modificar, donde los polímeros se forman en mayor cantidad en la frontera del carbón vítreo y menor cantidad en su centro, ya que las moléculas a ser electropolimerizadas pueden aproximarse desde varias direcciones.

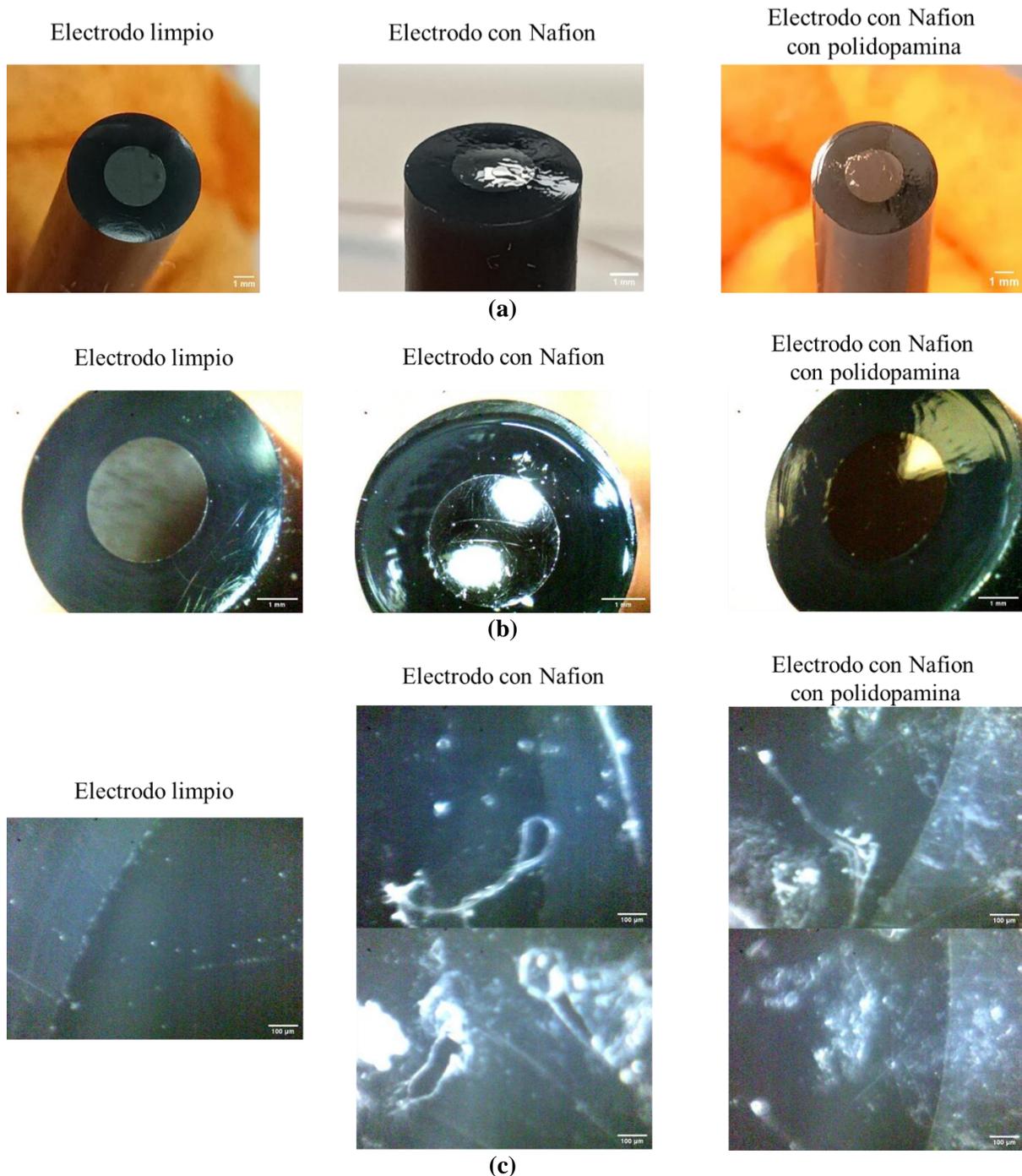


Figura 36: Caracterización óptica de la plataforma voltamperométrica. a) Mediante cámara de un celular convencional. b) Por microscopía óptica de 50x. c) Por microscopía óptica de 400x.

La membrana de Nafion permite retener a la polidopamina en la plataforma voltamperométrica ya que funciona como un enrejado o enmallado cuando se prepara a partir de agua con alcoholes (Ma et al. 2009). Sin embargo, a pesar de contar con la membrana de Nafion, la polidopamina aún se lixivia, lo que es algo común en los sensores voltamperométricos, aunque en menor medida que si no se tuviera la membrana de Nafion.

De hecho, se observó que entre mayor es el pH la polidopamina se pierde con mayor facilidad. Una posible idea para explicar esto es que el Nafion, al tener grupos sulfonatos, estará cargado negativamente en toda la escala de pH, mientras que la polidopamina, considerando los valores de pKa de las especies precursoras, está cargada positivamente por la protonación del grupo amino a pH ácido, por lo que, la atracción electrostática a pH ácido entre la polidopamina y el Nafion (cargas opuestas) puede aumentar la retención de la polidopamina principalmente a pH ácido, mientras que a pH neutro y básico la polidopamina al no estar cargada o estar cargada negativamente es mucho más fácil que se difunda en la solución.

En la figura 37 se presentan los electrodos de carbón vítreo que se empelaron para el análisis de microscopia electrónica de barrido (SEM). Se observa que la membrana de Nafion es completamente translúcida y la polidopamina le da una coloración oscura a la membrana (Fig. 37a). En la figura 37b se muestran los electrodos recubiertos de oro para el análisis de SEM.

De las figuras 38-40 se presenta la caracterización de la plataforma voltamperometría por microscopia electrónica de barrido. En 38 se observa el electrodo de carbón vítreo completamente limpio con una superficie lisa. En el espectro de EDS se muestra únicamente la presencia del carbono por el carbón vítreo y oro debido a que los electrodos fueron recubiertos con este metal. En la figura 39 se presenta la modificación del electrodo con Nafion, el cual cubre completamente al carbón vítreo y le proporciona una superficie heterogénea pues se observan diferentes irregularidades. En el espectro de EDS se constata la presencia del Nafion por los átomos de flúor, oxígeno y azufre. Una vez que se adiciona la polidopamina, se observa una superficie mucho más homogénea, lo que se atribuye a que la polidopamina se forma sobre la superficie del Nafion y recubre toda la superficie, llenando las cavidades (Fig. 40). En el EDS se observa que la composición que la membrana cambio ya que se observa un aumento del porcentaje de carbono concerniente con la presencia de la polidopamina y una disminución de F, O y S (Fig. 40); sin embargo, no se observa la presencia del nitrógeno ya que su relación de peso en cada unidad de la polidopamina es menor al 10% y aún menor en proporción en toda la superficie; además de ser un elemento de bajo número atómico que produce rayos X de baja energía (Gazulla et al. 2013). También se presenta un pequeño porcentaje de K, el cual se debe a que la electropolimerización de la dopamina se lleva a cabo en buffer de fosfatos de potasio.

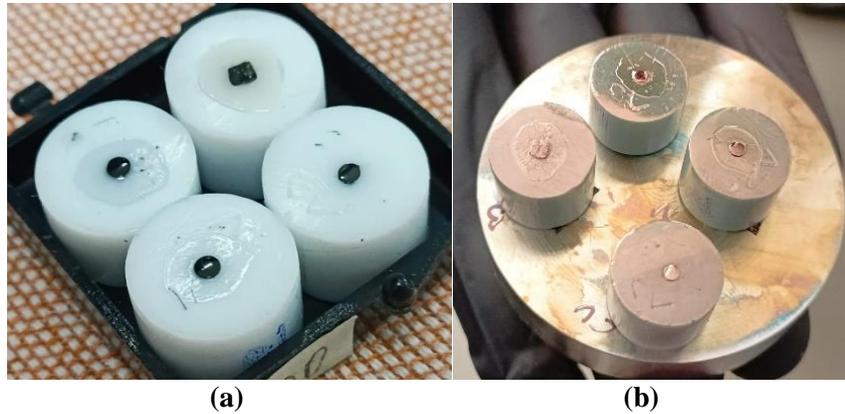


Figura 37: Fotografías de los electrodos modificados para Microscopia Electrónica de Barrido (SEM). a) Electrodos modificados. b) Electrodos modificados recubiertos de oro.

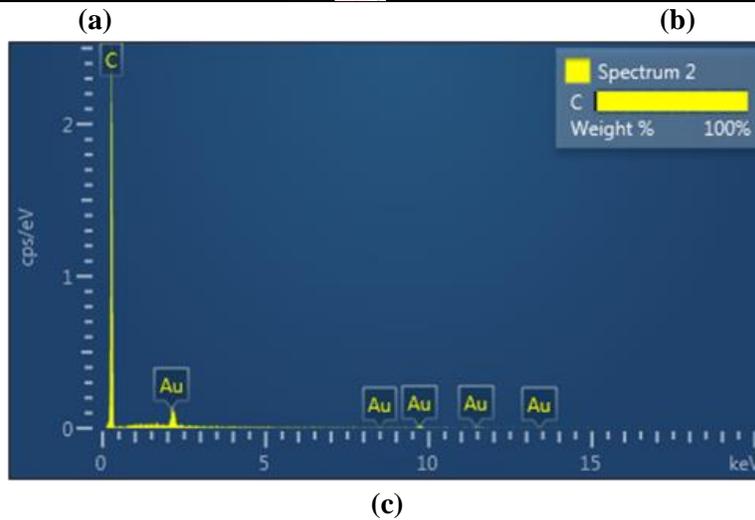
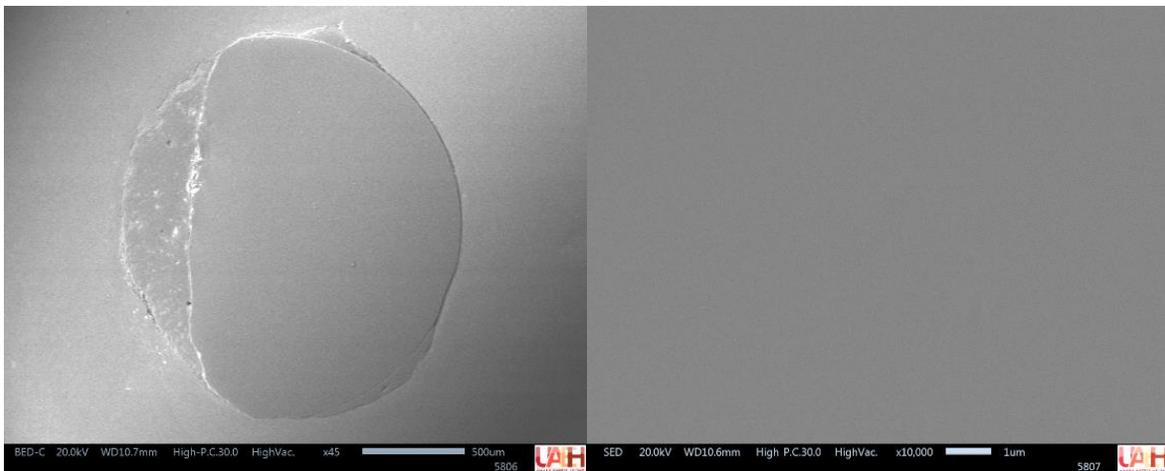


Figura 38: Caracterización del electrodo de carbón vítreo de la plataforma voltamperométrica de pH por Microscopia electrónica de barrido (SEM). a) A 45x. b) A 10000x. c) Espectro de EDS.

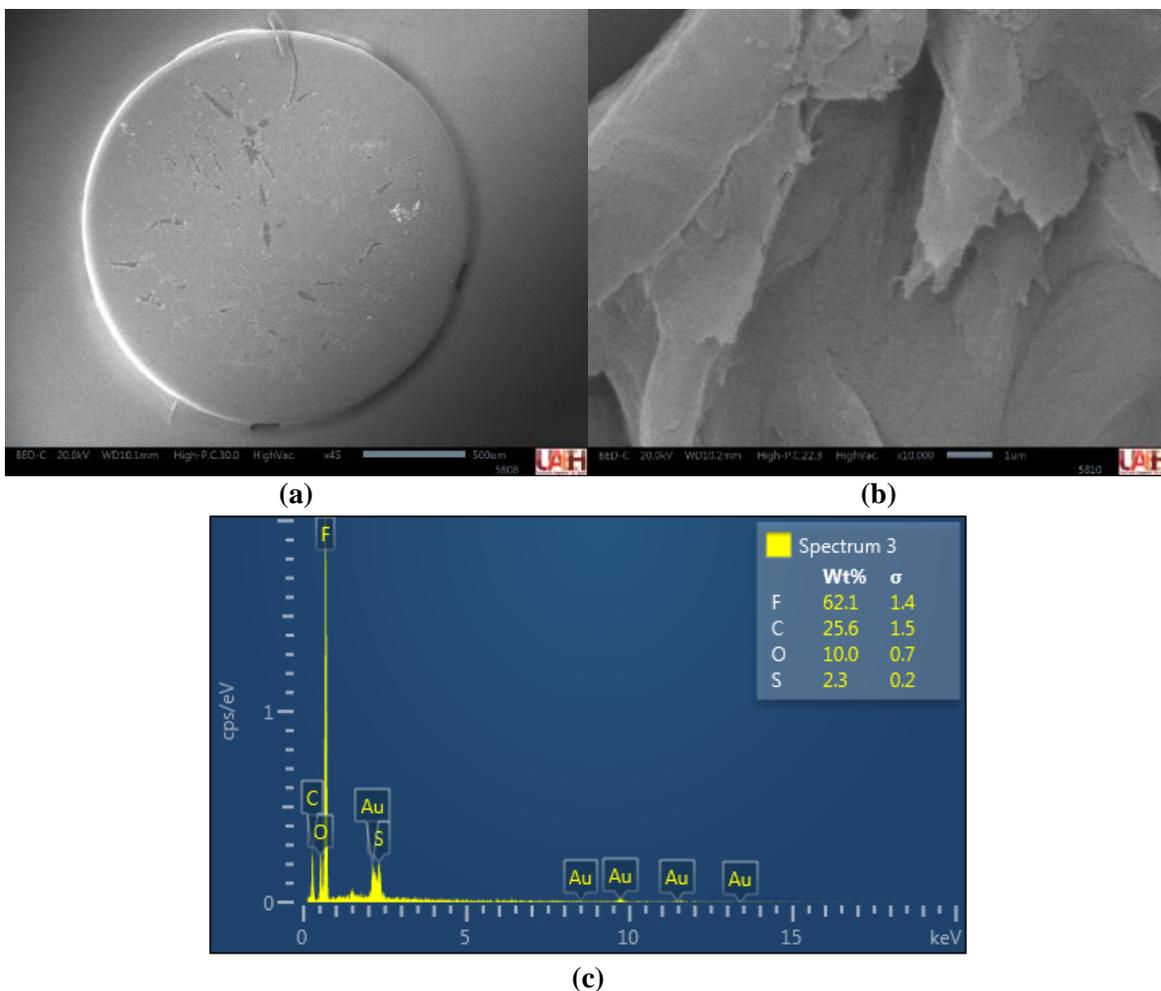


Figura 39: Caracterización de la membrana de Nafion sobre el electrodo de carbón vítreo de plataforma voltamperométrica de pH por Microcopia electrónica de barrido (SEM). a) A 45x. b) A 10000x. c) Espectro de EDS.

En las figuras 41 a 43 se muestra el mapeo de elementos del análisis EDS de la plataforma voltamperométrica. Se observa que la distribución de los elementos en el electrodo de carbón vítreo, la membrana de Nafion y el electrodo modificado con Nafion y polidopamina es homogénea. También se observa que hay un aumento en la presencia de carbono y oxígeno (Fig. 43) de la plataforma voltamperométrica en comparación con la membrana de Nafion (Fig. 42) debido a la presencia de la polidopamina, es decir, que como la polidopamina se electropolimeriza sobre la membrana de Nafion, habrá una mayor presencia de estos dos elementos en la plataforma como se mencionó con anterioridad.

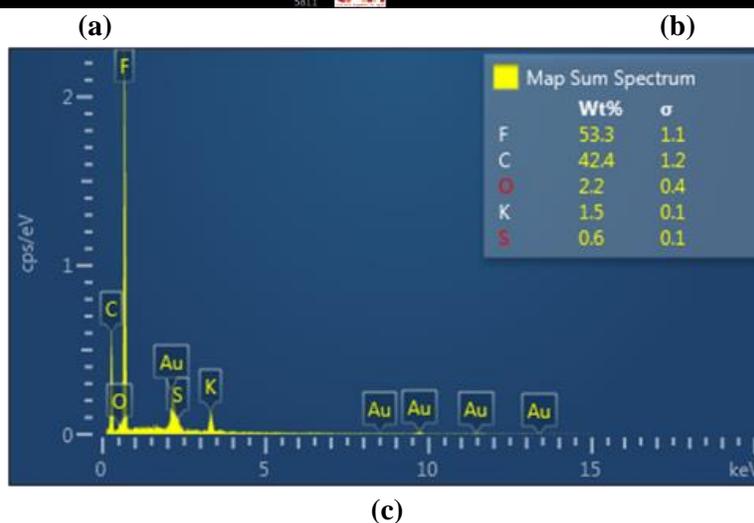
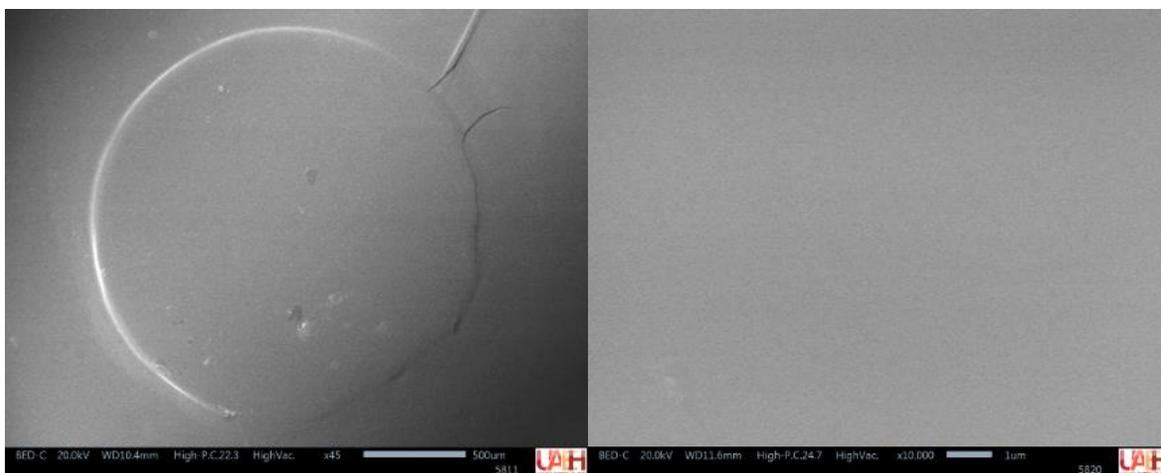


Figura 40: Caracterización de la plataforma voltamperométrica de pH por Microscopía electrónica de barrido (SEM). Electrodo modificado con polidopamina y la membrana de Nafion. a) A 45x. b) A 10000x. c) Espectro de EDS.

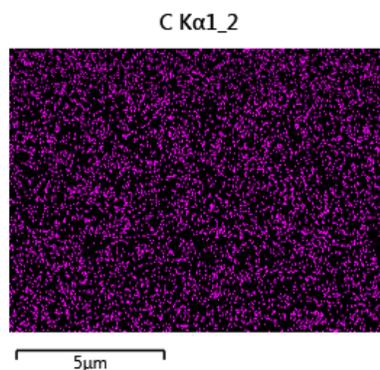


Figura 41: Mapeo de elementos del electrodo de carbón vítreo por EDS

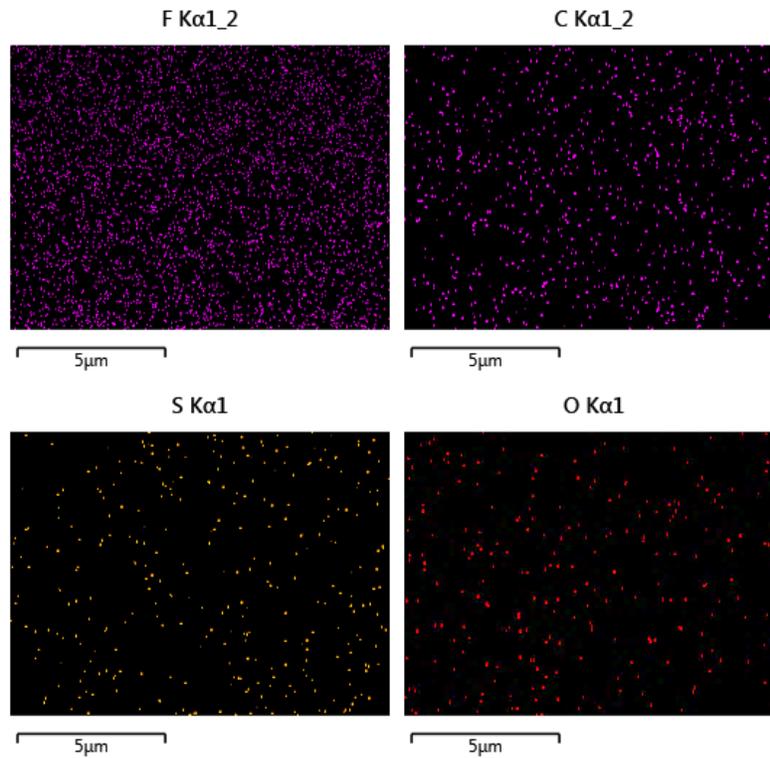


Figura 42: Mapeo de elementos del electrodo de carbón vítreo modificado con Nafion por EDS.

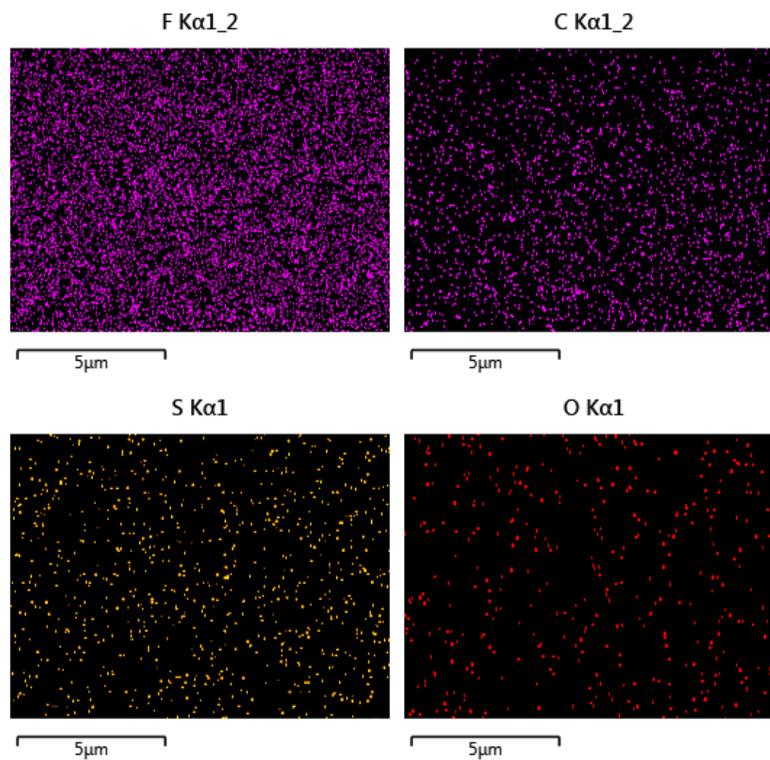


Figura 43: Mapeo de elementos del electrodo de carbón vítreo modificado con Nafion y polidopamina por EDS.

6.4.3 Caracterización de la plataforma voltamperométrica de pH por espectroscopia de infrarrojo.

Se caracterizó la plataforma voltamperométrica desarrollada por espectroscopia de infrarrojo analizando los espectros del material de partida, dopamina, la membrana de Nafion y la dopamina presente en la membrana de Nafion. En la figura 44 se muestran las fotografías de las membranas Nafion con polidopamina que se prepararon para el análisis por IR. En la figura 44a se muestra únicamente a la membrana de Nafion, la cual es completamente translúcida y difícil de ver. En la figura 44b se observa a la polidopamina (en su forma reducida) sobre la membrana de Nafion con su color negro característico (Chen et al. 2017). Finalmente, en la figura 44c se observa a la polidopamina después de ser oxidada en la zona circular central de la membrana con un color amarillo que indica que sufrió una transformación, mientras que en el resto de la membrana aún se observa la polidopamina reducida pues aún se observa un color ligeramente oscuro.

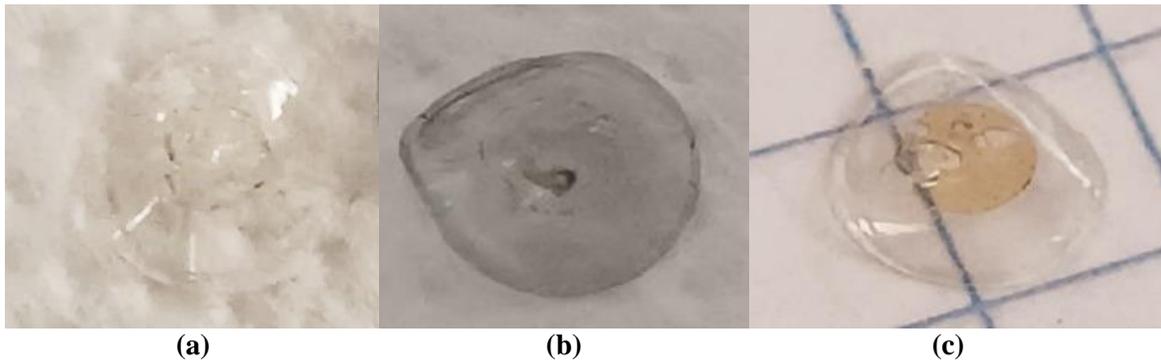


Figura 44: Fotografías de las membranas para el análisis de IR. a) Membrana de Nafion. b) Membrana de Nafion con polidopamina en su forma reducida. c) Membrana de Nafion con polidopamina en su forma oxidada.

IR Dopamina: En la figura 45a se presenta el espectro de infrarrojo de la dopamina: Se observan las bandas características: ν O-H banda ancha centrada en 3200 cm^{-1} , ν N-H 3334 cm^{-1} y 3207 cm^{-1} de amina primaria, ν C-H aromático a 3024 cm^{-1} , ν C-H 2995 cm^{-1} , ν C=C 1618 cm^{-1} y 1501 cm^{-1} de aromático, ν C-O a 1287 cm^{-1} y ω y τ C-H aromático 1, 2, 4-trisustituido a 877 cm^{-1} y 815 cm^{-1} (Carter et al. 1982).

IR Membrana de Nafion: En la figura 45b se aprecian las bandas características de la membrana de Nafion: ν_{as} y ν_{s} C-F de $-\text{CF}_2-$ en 1261 cm^{-1} y 1138 cm^{-1} respectivamente, la de ν S=O de SO_3H en 1059 cm^{-1} , la banda ν_{s} C-F de CFRCF_3 a 983 cm^{-1} y un hombro en esta señal a 970 cm^{-1} de ν C-O-C (Liang et al. 2004). También se observa una banda ancha en 3422 cm^{-1} y otra banda en 1623 cm^{-1} ambas relacionadas con la presencia de agua en la membrana de Nafion como se señala Ludvigsson et. al. (2000) y Gruger, et. al. (2001).

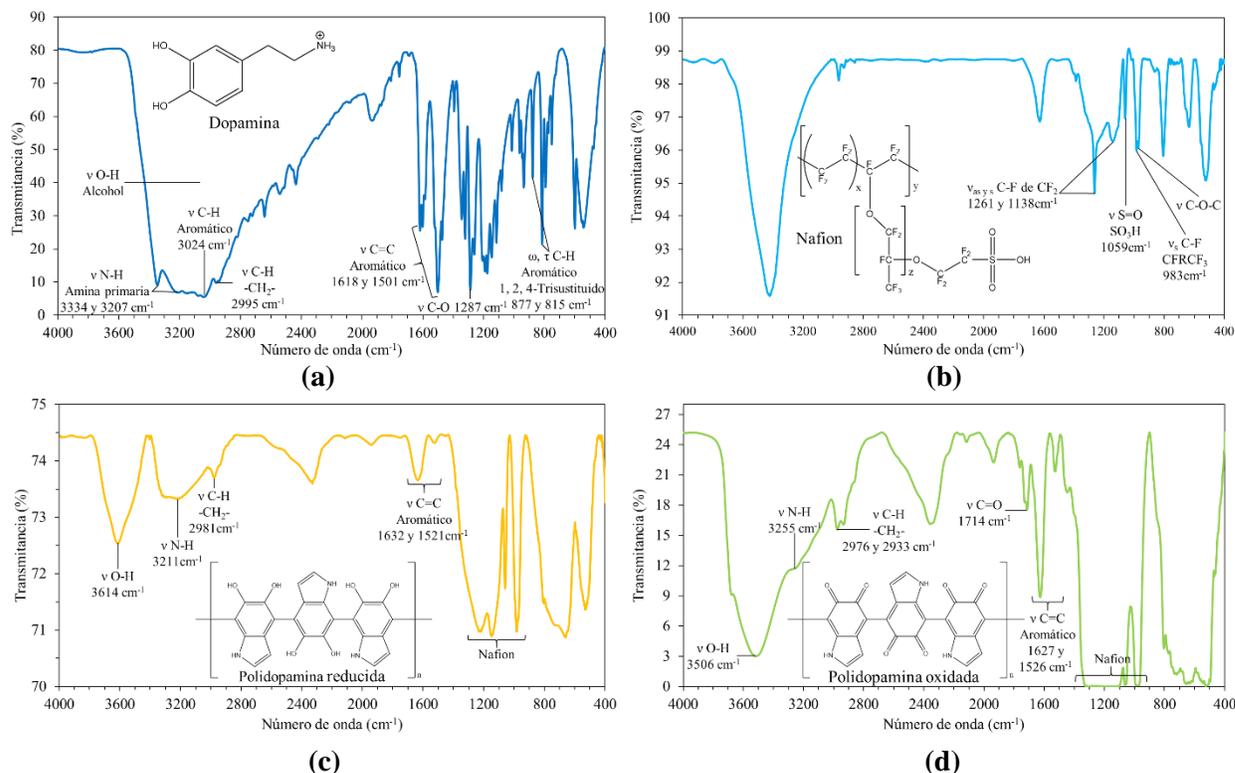


Figura 45: Espectros de IR. a) Dopamina. b) Membrana de Nafion. c) Polidopamina en su forma reducida. d) Polidopamina en su forma oxidada.

IR Polidopamina reducida/Nafion: En la figura 45c se presenta el espectro de IR de la polidopamina en su forma reducida. Se observan las bandas de la polidopamina: ν O-H 3614 cm^{-1} , ν N-H 3211 cm^{-1} , ν C-H de $-\text{CH}_2-$ en 2981 cm^{-1} , y las bandas de ν C=C de aromático en 1632 cm^{-1} y 1521 cm^{-1} , consistentes con una estructura de indol (Dreyer et al. 2012). Además, en el espectro se presentan tres bandas anchas alrededor de 3200 cm^{-1} , 1200 cm^{-1} y 650 cm^{-1} características de la polidopamina (Dreyer et al. 2012). También se muestran las bandas de Nafion: ν_{as} y ν_{s} C-F de $-\text{CF}_2-$ en 1219 cm^{-1} y 1149 cm^{-1} , respectivamente, la de ν S=O de SO_3H en 1060 cm^{-1} , la banda ν_{s} C-F de CFRCF_3 a 983 cm^{-1} y un hombro en esta señal a 975 cm^{-1} de ν C-O-C (Liang et al. 2004).

IR Polidopamina oxidada/Nafion: En la figura 45d se presenta el espectro de IR de la polidopamina oxidada electroquímicamente. Se observan las señales características de la polidopamina: ν N-H alrededor de 3255 cm^{-1} , ν C-H de $-\text{CH}_2-$ en 2976 cm^{-1} y 2933 cm^{-1} , las bandas de ν C=C de aromático en 1627 cm^{-1} y 1526 cm^{-1} y la banda de C=O en 1714 cm^{-1} , así como las señales de la membrana de Nafion ν_{as} y ν_{s} C-F de $-\text{CF}_2-$ alrededor de 1200 cm^{-1} , la de ν S=O de SO_3H en 1057 cm^{-1} , la banda ν_{s} C-F de CFRCF_3 en 975 cm^{-1} que se encuentra sobrepuesta con la banda ν C-O-C (Liang et al. 2004). Este espectro es congruente con el reportado por Dreyer et al. (2012) para la polidopamina oxidada con NaOCl. Comparando los espectros de IR de la dopamina reducida y oxidada se observan que la gran

diferencia corresponde a la aparición de la señal de carbonilo en 1714 cm^{-1} . La aparición de esta banda se debe a la oxidación electroquímica de los grupos alcohol de la polidopamina a grupos carbonilo, lo que confirma que el proceso de oxidación electroquímica de la polidopamina se lleva a cabo. La banda ν O-H 3506 cm^{-1} se atribuye a la presencia de agua en la membrana.

6.5 Aplicación de la plataforma voltamperométrica de pH

La plataforma voltamperométrica de pH se puso a prueba en la medición del pH de soluciones comerciales. En la tabla 9 se recopilan los promedios de mediciones por triplicado del pH en bebidas comerciales con la plataforma desarrollada y un electrodo de vidrio. Un análisis de comparación de medias t de Student ($p \leq 0.05$) revela que no existen diferencias significativas entre el pH promedio obtenido con el transductor voltamperométrico en comparación con el electrodo de vidrio para las muestras de jugo de manzana, bebida rehidratante, suero rehidratante y bebida probiótica, mientras que si existe una diferencia significativa para las demás muestras analizadas. Esto se atribuye a que las muestras con diferencias presentan especies electroactivos que afectan la medición del pH y para la muestra de hipoclorito de sodio se debe a que su pH se encuentra fuera del intervalo lineal de la polidopamina y a que al ser electroactivo y un agente oxidante oxida toda la polidopamina por lo que no se observa la señal de oxidación de la polidopamina. La precisión del sensor en las mediciones por triplicado tuvo una RSD menor al 5.5% y menor al 4% en las muestras con pH estadísticamente iguales al pH del electrodo de vidrio.

Tabla 9: Análisis de pH de muestras comerciales.

Muestra	pH de electrodo de vidrio	Plataforma voltamperométrica de pH desarrollada
Jugo de limón natural concentrado	1.84 ± 0.02	3.66 ± 0.20
Jugo de manzana	3.02 ± 0.02	2.93 ± 0.06
Bebida rehidratante	3.49 ± 0.03	3.40 ± 0.10
Suero rehidratante	3.98 ± 0.01	4.10 ± 0.10
Bebida probiótica	3.35 ± 0.02	3.48 ± 0.13
Café	4.82 ± 0.02	5.20 ± 0.12
Agua de sabor manzana	3.17 ± 0.02	4.00 ± 0.11
Enjuague bucal sin alcohol	4.01 ± 0.03	5.32 ± 0.28
Jugo de tomate	3.77 ± 0.02	3.13 ± 0.04
Leche entera	6.55 ± 0.02	5.17 ± 0.09
Leche de magnesia	10.20 ± 0.02	10.50 ± 0.04
Solución de NaOCl comercial	13.72 ± 0.02	Sin señal electroquímica

La plataforma voltamperométrica de pH se construyó a partir de un electrodo de carbón vítreo, Nafion y polidopamina ya que la polidopamina era pobremente retenida sobre la superficie del electrodo y al adicionar la membrana de Nafion esta permitió retener a la polidopamina.

La polidopamina presenta tres señales, una de oxidación (señal C) y dos de reducción (señales A y B) que presentan un comportamiento nernstiano en un amplio intervalo de pH de 1 a 13. Debido a que la señal C es la más intensa de las tres se eligió para la medición del pH. Mientras que la señal A por ser la segunda en intensidad, la más estable y encontrarse cercana a un potencial de 0 V a pH 7 se eligió para el desarrollo de los biosensores que se presentan en los capítulos siguientes.

La plataforma voltamperométrica presenta una sensibilidad de $61.0 \text{ mV/pH} \pm 1.6 \text{ mV/pH}$, con buena linealidad en un amplio intervalo lineal de pH de 0.5 a 13 y posee una excelente repetitividad y reproducibilidad y una elevada estabilidad. Además, es simple, económica, de fácil construcción y útil para la medición del pH.

También, se propone que la polidopamina se puede emplear para el desarrollo de un sensor potenciométrico de pH, ya que existe una relación nernstiana del potencial a corriente nula con el pH.

Se caracterizó la plataforma voltamperométrica de pH por voltamperometría, impedancia electroquímica es espectroscopia de infrarrojo y microscopía electrónica de barrido.

Se observó que el proceso de óxido-reducción de la polidopamina es químicamente reversible y se caracterizó por espectroscopia de infrarrojo. Al oxidar electroquímicamente a la polidopamina en el espectro de IR se hace visible la señal correspondiente al carbonilo, producida por la oxidación de los grupos alcohol a carbonilo.

La modificación con Nafion del electrodo hizo al dispositivo más resistivo, pero no de manera importante. Al adicionar la polidopamina se recuperó casi en totalidad la conductividad del carbón vítreo.

En el análisis por microscopía óptica se observa que la superficie de la plataforma es homogénea. En los espectros de EDS se confirma la presencia del Nafion y polidopamina y en los mapeos se observa que se depositan de manera homogénea.

Capítulo VII: Biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos

7.1 Funcionamiento del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos

El principio de funcionamiento empleado para el diseño de este biosensor se basa en un cambio de pH. En este caso, la lipasa hidroliza los triglicéridos para formar una molécula de glicerol y liberar tres ácidos carboxílicos (Fig. 46 y 47), los cuales disminuyen el pH de la solución, de esta manera a mayor concentración de triglicéridos se produce una disminución mucho mayor del pH. El transductor voltamperométrico detecta este cambio de pH debido a que los potenciales de oxidación de la polidopamina se desplazan hacia potenciales mayores con el aumento de la concentración de triglicéridos debido a la disminución del pH y entonces al relacionar estos potenciales con la concentración de tributirina, es posible cuantificar indirectamente los triglicéridos (Fig. 47).

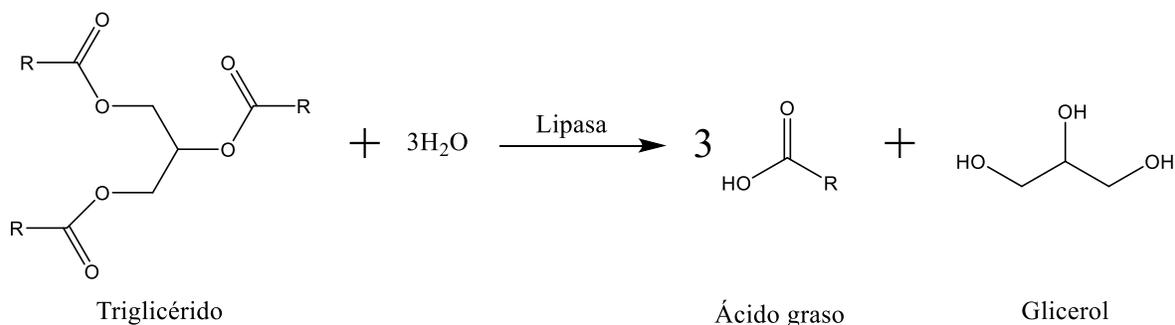


Figura 46: Hidrólisis enzimática de triglicéridos.

Se eligió a la señal A de la polidopamina para el desarrollo del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos por varias razones. La señal C no fue funcional en el biosensor mientras que la señal A si lo fue. La señal A es la segunda más intensa de las tres señales de la polidopamina y su uso adiciona una mayor selectividad al biosensor, pues al estar en potenciales menores pero cercanos a cero a pH 7 y desplazarse hacia potencial cero por la disminución de pH, se evitan potenciales donde diversas especies se puedan oxidar o reducir. Además, la señal A tiene una mayor intensidad en pH cercano a 7 que a otros pH.

Un punto importante durante la preparación del coctel enzimático, en la construcción del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos, es que primero se debe de disolver la enzima en el buffer de fosfatos para que la enzima se disuelva completamente y luego agregar el Nafion porque si se hace en orden contrario se afecta el diseño del dispositivo al grado de no ser funcional. Esto se atribuye a que los alcoholes en los cuales esta disuelto el Nafion pueden desnaturalizar a la lipasa.

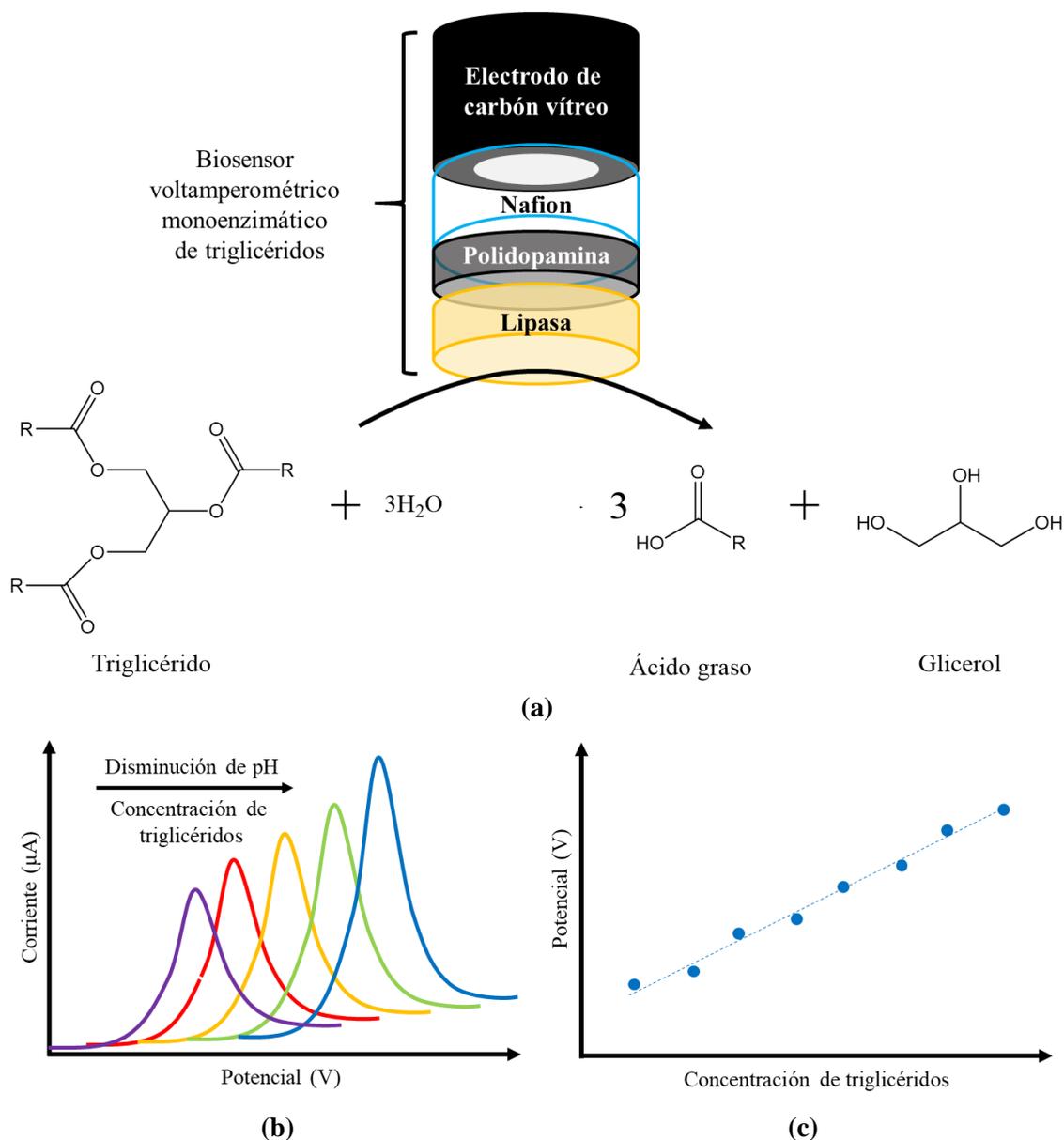


Figura 47: Representación del funcionamiento del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos. a) Funcionamiento del biosensor. b) Desplazamiento de los potenciales de oxidación de la polidopamina hacia potenciales mayores con el aumento de la concentración de triglicéridos. c) Curva potencial contra concentración de triglicéridos.

7.2 Acercamiento al desarrollo del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos

El biosensor desarrollado fue evaluado mediante curvas de calibración con soluciones estándar de tributirina. En la figura 48a se observa que con el aumento de la concentración de tributirina hay un desplazamiento de la señal A hacia potenciales mayores, lo que indica que se produce una disminución del pH. En la figura 48b se presenta la curva de calibración

potencial contra concentración de tributirina en la cual se observa una buena linealidad en un intervalo de concentración de 0.17 a 1.32 mM. A partir de la construcción y uso de 4 biosensores se obtuvo una sensibilidad de $84.1 \text{ mV}/[\text{TB}] \pm 1.8 \text{ mV}/[\text{TB}]$ y una excelente reproducibilidad en el valor de la sensibilidad con una desviación estándar relativa (RSD) de 1.4% a $\text{pH} = 7.5$ en buffer de fosfatos con goma arábica al 4% (4 biosensores diferentes, diferentes días).

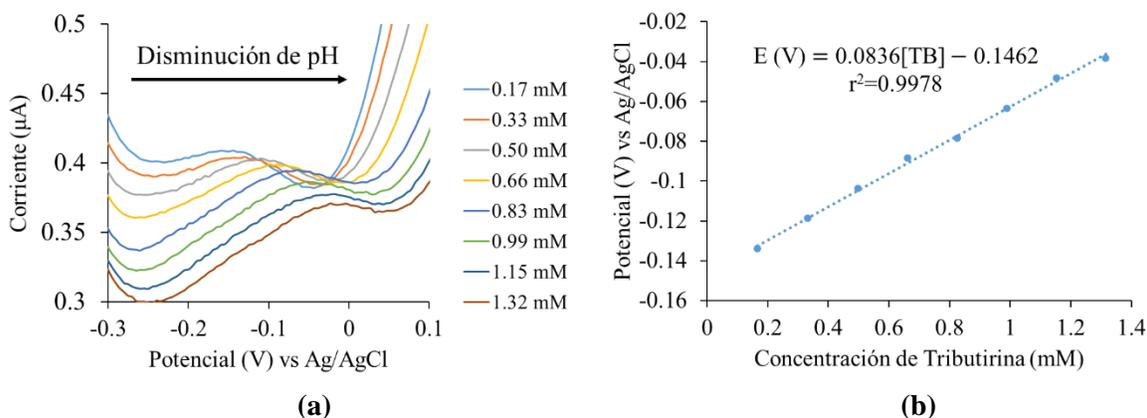


Figura 48: Evaluación del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos con tributirina. a) Voltamperogramas diferenciales de pulso a diferentes concentraciones de tributirina. b) Curva de calibración potencial contra concentración de tributirina.

En este punto, es importante mencionar que, debido a que el primer acercamiento al desarrollo del biosensor de triglicéridos se realizó en verano, mientras que su optimización se llevó a cabo en invierno, se observó que la temperatura tiene un efecto importante en la sensibilidad del biosensor. Antes de realizar su optimización, el biosensor se construyó y probó nuevamente bajo las condiciones del primer acercamiento, lo que se denominó como un segundo acercamiento. En este segundo acercamiento, el biosensor tuvo una sensibilidad de $41.6 \text{ mV}/[\text{TB}]$ (Fig. 49), lo que corresponde a una disminución de cerca del 50% de la sensibilidad respecto del primer acercamiento.

Entonces, una vez que se realizó la optimización del biosensor (ver sección 7.3) se obtuvo un incremento en la sensibilidad del 77% respecto del segundo acercamiento, por lo que, se concluyó que la optimización mejoró de manera sustancial la sensibilidad del biosensor.

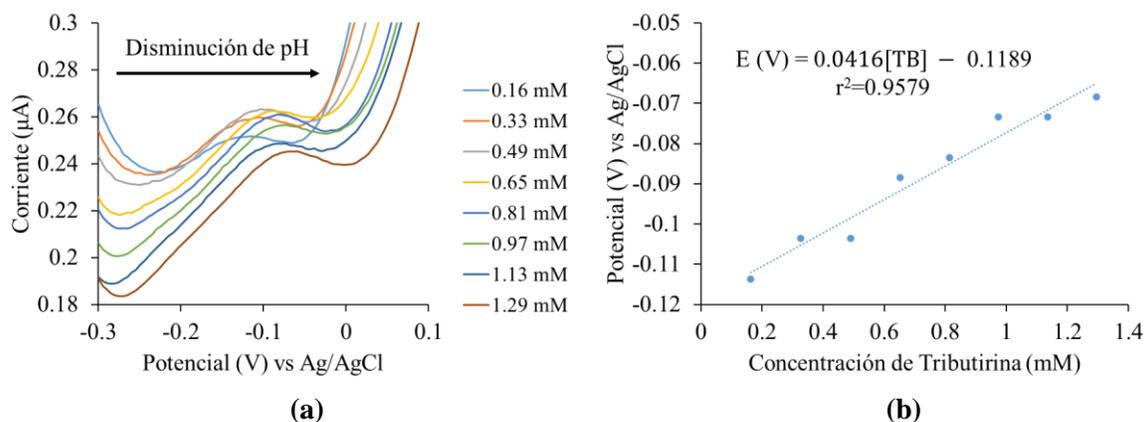


Figura 49: Evaluación del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos con tributirina en época de frío. a) Voltamperogramas diferenciales de pulso a diferentes concentraciones de tributirina. b) Curva de calibración potencial contra concentración de tributirina.

7.3 Optimización del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos

Inicialmente se optó por optimizar la plataforma voltamperométrica de pH y el biosensor por separado. La optimización de la plataforma (Señal A) se reporta en el Anexo 1.2. Sin embargo, esta aproximación no fue funcional, debido a que las mejores condiciones de la plataforma no necesariamente serán las mejores del biosensor, por lo que se decidió optimizar la plataforma voltamperométrica de pH y el biosensor de manera conjunta.

Los resultados de la optimización del biosensor monoenzimático de triglicéridos se presentan en la tabla 10. En esta ocasión el intervalo de electropolimerización de la dopamina se cambió de -0.4 a +1.3 V a -0.4 a +1.4 V, ya que en la optimización de la plataforma voltamperométrica de pH (señal A) empleando concentraciones mayores a 5 mM de dopamina, este intervalo maximizaba la sensibilidad (Anexo 1.3). Las mejores condiciones para maximizar la sensibilidad son: una concentración 15 mM de dopamina, cinco ciclos, 2 mg de enzima disuelta en una mezcla de 100 μL de Buffer de fosfatos 1 mM pH 7 más 40 μL de Nafion al 5% (Fig. 50). Al igual que en el caso de la plataforma, un menor número de ciclos maximiza la sensibilidad. Caso contrario, una mayor concentración de dopamina mejora la sensibilidad, esto se atribuye a que se forma una capa de polidopamina de mayor tamaño, lo que permite una mejor detección del cambio de pH.

Es importante señalar en las primeras aproximaciones, el diseño del biosensor ya se encontraba cerca de las condiciones óptimas pues únicamente cambió la concentración de dopamina de 5 a 15 mM y la cantidad de Nafion + Buffer de 30 + 110 a 40 + 100 μL, mientras que mantuvo el mismo número de ciclos y los dos miligramos de enzima.

Tabla 10: Resultados del diseño de experimentos Taguchi L₉ (3⁴) de la optimización del biosensor monoenzimático de triglicéridos.

Orden de análisis	Experimento	Factores				Respuesta
		[Dopamina] (mM)	No. Ciclos	Enzima (mg)	Nafion+Buffer (μL)	Sensibilidad (mV/mM)
4	1	5	5	2	20+120	51.3
5	2	5	10	3	30+110	21.8
2	3	5	15	4	40+100	48.7
3	4	10	5	3	40+100	58.3
7	5	10	10	4	20+120	33.1
1	6	10	15	2	30+110	39.2
6	7	15	5	4	30+110	69.6
9	8	15	10	2	40+100	61.8
8	9	15	15	3	20+120	60.0

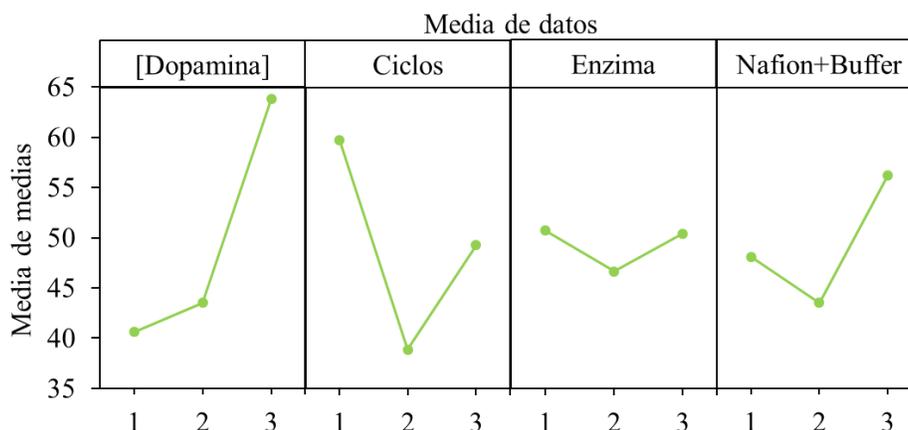


Figura 50: Gráfico de efectos principales para medias del diseño Taguchi para la optimización integral del biosensor enzimático de triglicéridos.

En la figura 51 se presenta la evaluación del biosensor monoenzimático de triglicéridos construido en las condiciones óptimas. Se observa que con el aumento de la concentración de tributirina hay un desplazamiento de la señal A hacia potenciales mayores, lo que indica una disminución del pH debido a la formación de los ácidos grasos, y que el biosensor es funcional. Se obtuvo una mayor sensibilidad en la curva potencial contra concentración de tributirina (73.5 mV/[tributirina (mM)]) como indicó el diseño de experimentos.

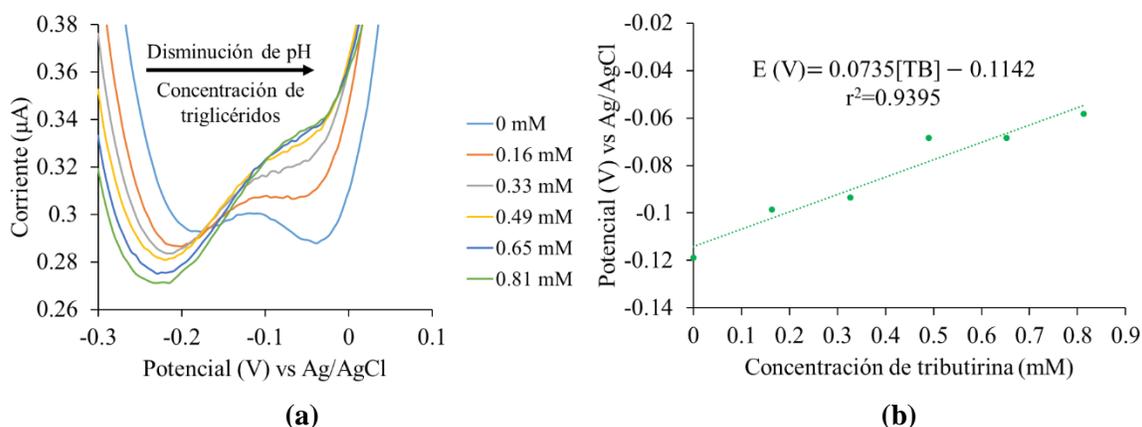


Figura 51: Biosensor monoenzimático de triglicéridos en las condiciones óptimas. a) Voltamperogramas diferenciales de pulso. b) Curva de potencial contra concentración de tributirina.

En la tabla 11 se presentan los parámetros analíticos del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos. El biosensor posee excelente repetitividad y reproducibilidad de su sensibilidad y su construcción es igualmente muy reproducible. Además, el biosensor es muy estable pues se lograron realizar tres curvas de calibrado con un mismo biosensor.

La repetitividad con un mismo biosensor se llevó a cabo realizando tres curvas de calibrado con el mismo biosensor, y una vez que la señal A disminuyó de intensidad, esta se recuperó mediante la oxidación electroquímica la polidopamina a +0.2 V durante dos minutos. Esta oxidación se llevó a cabo antes de realizar cada una de las dos últimas curvas de calibrado. La oxidación mejoró la intensidad y la calidad de la señal de reducción de la polidopamina (señal A). En la primera oxidación la señal se recuperó un 28%, por lo que este proceso permite regenerar la señal electroquímica del biosensor y por ende aumentar el número de mediciones que se pueden realizar con el mismo biosensor, de lo cual se obtuvo que un mismo biosensor es capaz de realizar más de 18 mediciones. Este hecho resalta la importancia de haber caracterizado que el proceso de óxido-reducción de la polidopamina es químicamente reversible, ya que sirvió para mejorar las características de medición del biosensor y como veremos más adelante un mismo biosensor permitió realizar la medición de una misma muestra por triplicado.

En la tabla 12 se compara el biosensor voltamperométrico enzimático diseñado en este trabajo con algunos biosensores electroquímicos de triglicéridos reportados en la literatura. Se puede notar que el dispositivo desarrollado es competitivo con los biosensores reportados. Entre las ventajas que posee se encuentra su bajo costo y fácil construcción en comparación con los reportados pues no requiere de componentes de elevado valor como las nanopartículas de oro, la polidopamina es fácil de electropolimerizar a partir de la dopamina,

emplea un electrodo de carbón vítreo y la modificación de este, como se mencionó en la metodología, es rápida y sencilla.

Tabla 11: Parámetros analíticos del biosensor monoenzimático de triglicéridos.

Sensibilidad	70.6 ± 2.9 mV/[TB]
Intervalo lineal	0.16 a 1.29 mM de TB
Repetitividad (3 biosensores diferentes, mismo día)	RSD de 1.76% (72.5 ± 1.3 mV/[TB])
Reproducibilidad (3 biosensores diferentes, diferentes días)	RSD de 3.74% (69.6 ± 2.6 mV/[TB])
Repetitividad (un mismo biosensor, tres curvas mismo día)	RSD de 4.60% (65.3 ± 3.0 mV/[TB])
Reproducibilidad en proceso de construcción (7 biosensores diferentes)	RSD de 5.10% (70.2 ± 3.6 mV/[TB])

Tabla 12: Biosensores electroquímicos para la cuantificación de triglicéridos basados en un cambio de pH.

Tipo de biosensor	Composición	Intervalo lineal	Referencia
Potenciométrico	Lipasa/Nanopartículas de NiFe ₂ O ₄ /ISFET	5-30 mM	Vijayalakshmi et al. (2008)
Potenciométrico	Lipasa/Si ₃ N ₄ /Si-SiO ₂ /EISCAP	1-7 mM	Fernandez et al. (2009)
Potenciométrico	Lipasa/Nanopartículas de CeO ₂ /ITO	0.17-1.65 mM	Solanki et al (2009)
Amperométrico	Lipasa/NPG/GCE	0.17-0.83 mM	Wu et al. (2014)
Amperométrico	Lipasa/GNps/Polidopamina/ITO	0.17-0.99 mM	Zhang et al. (2014b)
Amperométrico	Lipasa/Nafion/PVM/GCE	0.200 a 0.596 mM	Cruz Aburto (2021)
Voltamperométrico	Lipasa/Nafion/Polidopamina/GCE	0.16 a 1.29 mM	Este trabajo

GCE: Electrodo de carbón vítreo; EISCAP: Electrolyte–insulator–semiconductor capacitor; NPG: oro nanoposoro; GNps; nanopartículas de oro; PVM: poli-verde malaquita.

7.4 Caracterización del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos

7.4.1 Caracterización del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos por espectroscopia de impedancia electroquímica

En la figura 52 se presenta el estudio de impedancia en donde se muestra que el biosensor en las condiciones óptimas es menos conductor que la plataforma voltamperométrica con una resistencia de 166.9 Ω; sin embargo, no se observa un aumento importante de la resistividad del dispositivo.

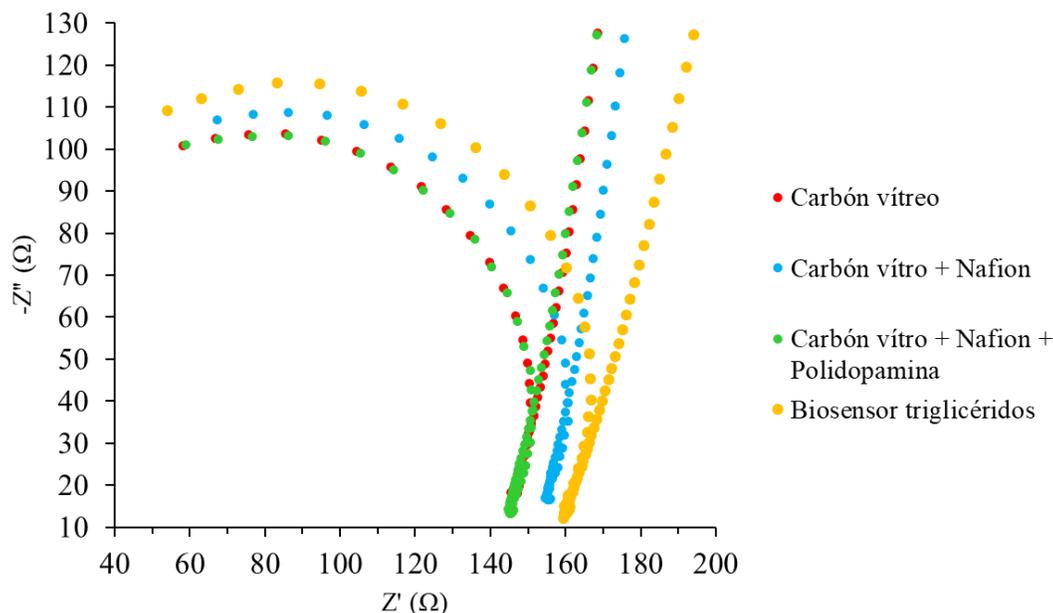


Figura 52: Impedancia electroquímica: Diagrama de Nyquist para el biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos, en el intervalo de frecuencias de 1×10^6 a 1×10^3 Hz en solución 5 mM de $K_4[Fe(CN)_6]$, 5 mM de $K_3[Fe(CN)_6]$ y 0.05 M de KCl.

7.4.2 Caracterización del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos por Microcopia electrónica de barrido

Retomando la figura 37a, en la que se presentan los electrodos modificados para el análisis por SEM, se observa que la adición de la enzima torna la membrana de un color amarillo (electrodo superior). En la figura 53 se presenta la caracterización por Microscopia electrónica de barrido del biosensor enzimático de triglicéridos. En la figura 53a se observa que la superficie del biosensor es irregular y bastante heterogénea con surcos, grietas, deformaciones y zonas lisas, donde la membrana cubre completamente la superficie del carbón vítreo. También se observan unos puntos blancos que corresponden a la presencia de la enzima lipasa. En la figura 53b se observan una superficie amorfa con secciones blancas debido a la presencia de la enzima lipasa. En el EDS se observa que los porcentajes de los elementos respecto de la plataforma voltamperométrica cambiaron debido a la adición del coctel enzimático. Se observa el F, O y S por la membrana de Nafion y C de la polidopamina y de la enzima. También se muestra la presencia de K y P, los cuales se deben a que para disolver la enzima se usó un buffer de fosfatos de potasio.

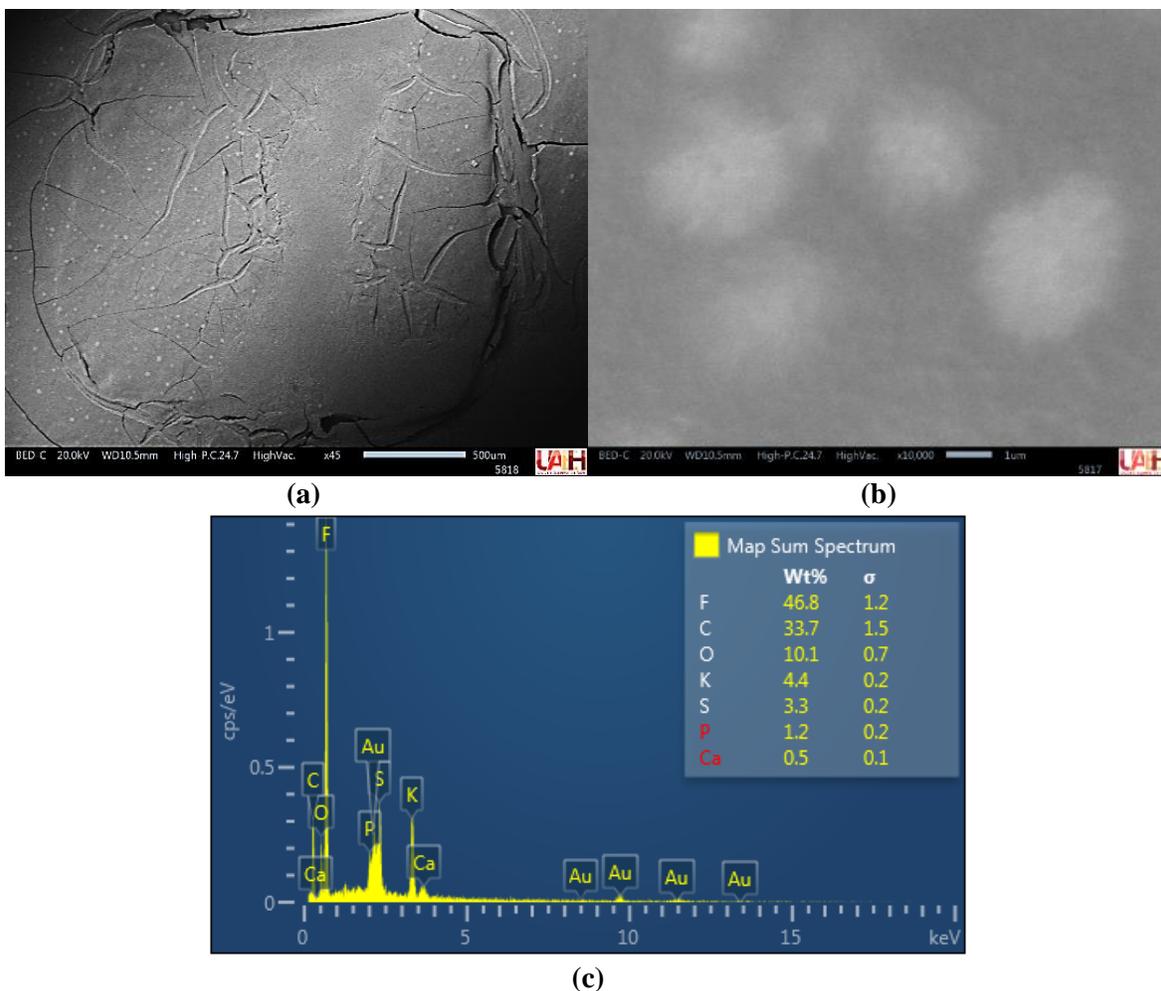


Figura 53: Caracterización del biosensor monoenzimático de triglicéridos por microscopía electrónica de Barrido (SEM). a) A 45x. b) A 10000x. c) Espectro de EDS.

En la figura 54 se presenta el mapeo elemental de EDS, en el cual se observa una distribución homogénea de los elementos y que hay una mayor presencia de azufre y oxígeno en comparación con la plataforma voltamperométrica (Fig. 43), ya que, para la preparación del biosensor, a la plataforma se le agrega el coctel enzimático que contiene Nafion, por ende, la presencia de azufre y oxígeno sobre el electrodo aumenta.

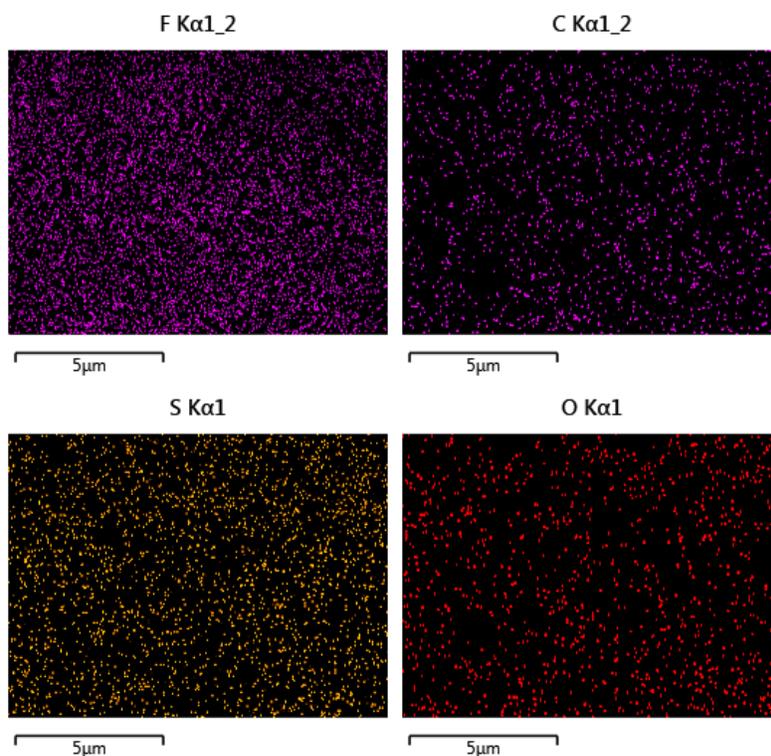


Figura 54: Mapeo de elementos del biosensor enzimático de triglicéridos

7.5 Aplicación del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos

El biosensor de triglicéridos se probó en la cuantificación de triglicéridos en muestras comerciales de aceites de canola, oliva, soya, maíz y cártamo, ya que son los aceites comestibles más consumidos en México (Consumidor 2010), mediante adición patrón, empleando tributirina como solución estándar y los cálculos presentados en el Anexo 2. Después de cada adición de la muestra o del estándar, se agitó la solución durante 30 segundos y se esperó 10 minutos adicionales antes de realizar cada medición para que se produjera un cambio de pH.

Como ejemplo representativo en la figura 55 se presenta el análisis para el aceite de canola. En la figura 55a se observa de la señal se desplaza hacia potenciales mayores con la adición de la muestra y el estándar, mientras que en la figura 55b se observa la curva de adición patrón, potencial contra concentración de tributirina. Finalmente, en la tabla 13 se muestran las concentraciones encontradas con el biosensor desarrollado para los diferentes aceites. Las concentraciones de triglicéridos encontradas fueron congruentes con lo esperado para cada aceite. También se observa que el biosensor posee buena precisión para la cuantificación de triglicéridos principalmente en los aceites de canola, oliva y soya.

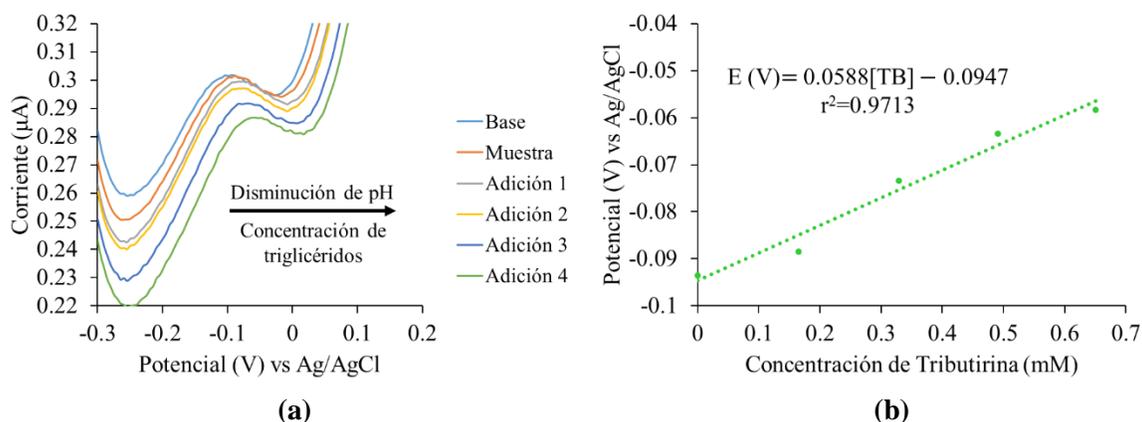


Figura 55: Análisis del aceite de Canola. (a) Voltamperogramas diferenciales de pulso. (b) Curva de adición patrón potencial contra concentración de tributirina.

Las concentraciones de triglicéridos encontradas fueron congruentes con lo esperado ya que los aceites vegetales son muestras bastantes complejas y a que su composición de triglicéridos representa entre el 95 y 98% de la composición total del aceite (Indelicato et al. 2017). Es importante notar que cada aceite se midió por triplicado con un mismo biosensor, gracias a la recuperación de la señal al oxidar la polidopamina durante un minuto a +0.2 V. Inclusive se observó que debido al tiempo de análisis el oxígeno presente en la solución era suficiente para regenerar la señal de la polidopamina ya que la señal se mantuvo con buenas características y la oxidación de la polidopamina por acción del oxígeno produjo un flujo de corriente. El biosensor monoenzimático de triglicéridos desarrollado presenta una buena precisión principalmente en las muestras de aceite de canola, oliva y soya.

Tabla 13: Concentración de triglicéridos en aceites comerciales.

Muestra	Concentración de triglicéridos (M)	RDS%
Aceite de canola	0.94 ± 0.04	4.40%
Aceite de oliva	0.98 ± 0.07	7.20%
Aceite de Soya	0.96 ± 0.07	6.99%
Aceite de maíz	1.00 ± 0.17	17.00%
Aceite de cártamo	0.96 ± 0.18	19.41%

La plataforma voltamperométrica de pH se empleó con éxito para el desarrollo del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos. El biosensor presenta una sensibilidad de 70.6 ± 2.9 mV/[TB] en un intervalo de 0.16 a 1.29 mM de TB, excelente repetitividad y reproducibilidad y reproducibilidad en el proceso de construcción. Además, es bastante estable y es útil en la cuantificación de triglicéridos en muestras de aceites.

El biosensor, construido a partir de la plataforma voltamperométrica de pH en sus condiciones óptimas o en las condiciones óptimas para el biosensor, fue útil para la cuantificación de triglicéridos. De esto, se tiene que la plataforma es funcional para el desarrollo de nuevos sensores electroquímicos.

El biosensor de triglicéridos desarrollado es competitivo contra los reportados previamente en la literatura que cuantifican por un cambio de pH. Presenta un intervalo lineal similar al de trabajos reportados, sin embargo, su facilidad de construcción y su bajo costo lo sitúan como una excelente alternativa para la cuantificación de triglicéridos.

El biosensor se caracterizó por impedancia electroquímica y microscopía electrónica de barrido. El biosensor es más resistivo que la plataforma voltamperométrica, sin embargo, este efecto no es importante. En el análisis por microscopía electrónica de barrido se observó que la superficie del biosensor es bastante heterogénea y se logran ver cúmulos de la enzima lipasa.

Capítulo VIII: Biosensor voltamperométrico monoenzimático de glucosa

8.1 Funcionamiento del biosensor voltamperométrico monoenzimático de glucosa

Al igual que en caso del biosensor de triglicéridos, el cambio de pH se empleó como principio de transducción para el biosensor monoenzimático de glucosa. La glucosa oxidasa oxida a la D-glucosa para formar D-gluconolactona y H_2O_2 y la D-gluconolactona se hidroliza a ácido D-gluónico (Bankar et al. 2009) el cual disminuye el pH de la solución (Fig. 56 y 57). A partir de este cambio de pH se puede cuantificar la glucosa ya que la disminución del pH desplaza las señales de la polidopamina hacia potenciales mayores y se obtiene una relación entre la concentración de glucosa y los valores de potencial de las señales desplazadas (Fig. 57). Igual que en caso del biosensor de triglicéridos, se eligió a la señal A para el diseño de biosensor de glucosa ya que demostró ser funcional en el biosensor de triglicéridos y mejora la selectividad del dispositivo por estar a un potencial cercano a cero a pH 7.

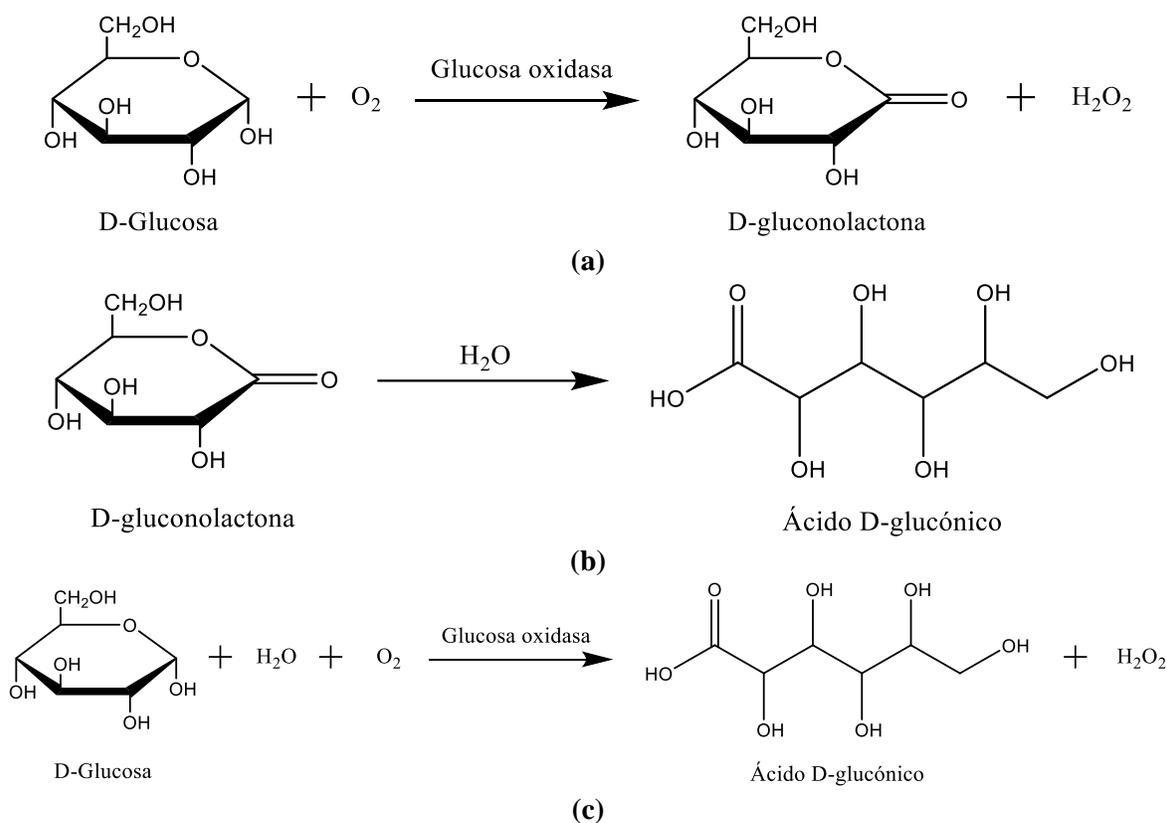


Figura 56: Reacciones involucradas en el funcionamiento del biosensor voltamperométrico monoenzimático de glucosa. a) Reacción enzimática de la glucosa oxidasa. b) Hidrólisis de D-gluconolactona. c) Reacción general.

enzimático, preparado con 100 μL de buffer de fosfatos 1 mM pH 7, 40 μL de Nafion y 10 mg de la enzima glucosa oxidasa debido a que esta se encontraba muy poco activa, el cóctel se dejó secar a temperatura ambiente. El biosensor desarrollado fue evaluado mediante curvas de calibración con soluciones estándar de glucosa haciendo adiciones sucesivas de 30 μL de glucosa 0.1 M con un tiempo de espera de 10 minutos entre cada adición. En la figura 58a se observa que con el aumento de la concentración de glucosa hay un desplazamiento de la señal hacia potenciales mayores, lo que indica que se produce una disminución del pH y el biosensor es funcional. En la figura 58b se presenta la curva de calibración potencial contra concentración de glucosa en la cual se observa una sensibilidad de 36.3 mV/[glucosa(mM)] y buena linealidad en un intervalo de concentración de 0.25 a 1.96 mM.

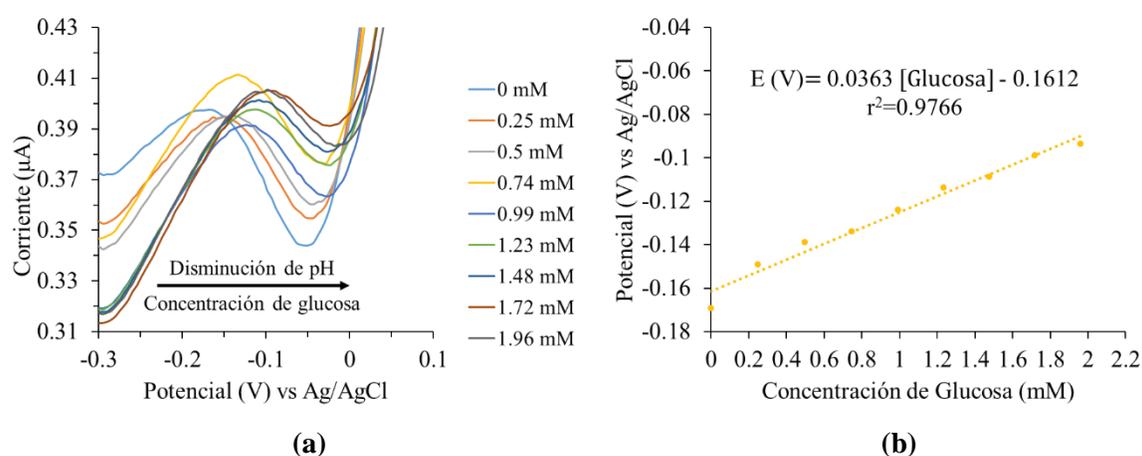


Figura 58: Biosensor monoenzimático de glucosa. a) Voltamperogramas diferenciales de pulso del biosensor. b) Curva de potencial contra concentración de glucosa.

Debido a que la enzima que se usó para el primer acercamiento al biosensor monoenzimático de glucosa se encontraba muy inactiva, se decidió emplear una enzima nueva para el desarrollo del biosensor de glucosa. Sin embargo, esto causó otros problemas. Se observó que la enzima glucosa oxidasa al entrar en contacto con el Nafion se comenzaba a agrupar de manera irregular, lo que puede atribuirse a que la enzima se desnatura por los alcoholes en los que esta disuelto el Nafion y la enzima no se logró inmovilizar completamente sobre la superficie de la plataforma voltamperométrica o del electrodo. A continuación, se presentan las diversas estrategias que se realizaron para la construcción del biosensor monoenzimático de glucosa.

Plataforma (GCE/Nafion/Polidopamina)/Enzima en Nafion: Al comienzo, se construyó el biosensor monoenzimático de glucosa de la misma forma que el de triglicéridos. Se depositaron 10 μL de Nafion sobre el electrodo de carbón vítreo, y se dejó secar a 40 $^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. Posteriormente se electropolimerizó la dopamina a una concentración 5 mM, 5 ciclos en el intervalo de -0.4 a +1.3 V. Luego se depositaron 20 μL del coctel enzimático

preparado con 2 mg de la enzima glucosa oxidasa, 110 μL de buffer de fosfatos pH 7 y 30 μL de Nafion al 5% y se dejó secar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se observó que durante el secado la membrana del coctel enzimático se deforma, de tal forma que la parte externa se despegaba del electrodo. Una vez en solución esta parte despegada se rompía y se dispersaba en la solución al igual que toda la membrana de la enzima. Posteriormente, se preparó el biosensor con 1mg de enzima. Sin embargo, la membrana se seguía despegando en el secado y se rompía en solución y toda la membrana con la enzima pasaba a solución.

GCE/Nafion/Polidopamina/Enzima: En otra opción evaluada, una vez preparada la plataforma voltamperométrica se depositaron 20 μL del coctel enzimático preparado únicamente disolviendo la enzima en el buffer de fosfatos y se dejó secar a temperatura ambiente. Esta opción fijó de mejor manera la enzima en el secado, pero en solución al mínimo contacto físico la enzima se despegaba completamente del electrodo.

GCE/Enzima en Nafion/Polidopamina: Debido a que la enzima no se fijaba adecuadamente sobre la plataforma se decidió construir el biosensor adicionando primero el coctel enzimático sobre la superficie del electrodo de carbón vítreo y luego electropolimerizando la dopamina sobre la membrana enzimática. En esta ocasión la enzima se mantuvo fija sobre la superficie del electrodo, sin embargo en solución la señal electroquímica se desplazaba a potenciales menores y con el paso del tiempo se observaba que la enzima se difundía completamente a la solución. De manera similar, en otra aproximación se depositaron 20 μL del coctel enzimático con Nafion sobre la superficie del electrodo de carbón vítreo y después 10 ml de Nafion adicionales, posteriormente se electropolimerizó la dopamina. La enzima se retuvo de mejor manera, pero se requirió de unos 30 minutos de hidratación. Si bien, el biosensor funcionó pues el pH disminuyó de 7.29 a 6.95 después de 5 adiciones sucesivas de 20 μL glucosa 0.1 M, la señal se mantuvo constante en las primeras adiciones, pero después se desplazaba de manera incorrecta a potenciales menores y la enzima se seguía perdiendo en solución.

GCE/Enzima/Nafion/Polidopamina: En otro intento, el biosensor se construyó depositando 20 μL de la enzima disuelta únicamente en buffer de fosfatos sobre la superficie del electrodo de carbón vítreo y dejando secar, posteriormente se depositaron los 10 μL de la membrana de Nafion y se electropolimerizó la dopamina, igualmente la enzima se fijó mejor durante el secado pero con el paso del tiempo la enzima se seguía difundiendo a la solución y la señal electroquímica de la polidopamina se desplazaba a potenciales menores debido a la pérdida de la enzima.

GCE/Nafion/Polidopamina/Enzima/Nafion: Con una idea similar a la anterior, el biosensor se preparó a partir de la plataforma voltamperométrica de pH, a la cual se le depositaron 20 μL del coctel enzimático, preparado únicamente con 1 mg de enzima en 100 μL del buffer de fosfatos, posteriormente se depositaron 20 μL de Nafion y se dejó secar. Esta aproximación mantuvo mejor fijada a la enzima, sin embargo, requirió de un largo tiempo de

hidratación de la membrana mayor a una hora, por lo que no es plausible su uso. La señal de la polidopamina en las primeras dos adiciones se desplazó a potenciales mayores, la enzima se perdió nuevamente en solución y el pH paso de 7.35 a 6.95 después de 5 adiciones sucesivas de 20 μL glucosa 0.1 M.

GCE/Nafion/Polidopamina/Enzima/Nafion: Finalmente, el biosensor se preparó a partir de la plataforma voltamperométrica, a la cual se le depositaron 20 μL del coctel compuesto por 1 mg de la enzima disuelta en 100 μL del buffer de fosfatos, se dejó secar y posteriormente se adicionaron 10 ml de Nafion. Esta vez la enzima se retuvo y el tiempo de hidratación de la membrana disminuyó a unos 15 minutos, sin embargo, con el paso del tiempo una vez más la enzima se pierde en la solución, pero el biosensor como tal si fue funcional, ya que con 5 adiciones sucesivas cada cinco minutos de 20 μL de una solución 0.1 M de glucosa el pH cambio de 7.48 a 7.17, pero la señal se seguía desplazando incorrectamente hacia potenciales menores.

De las diferentes propuestas para el diseño del biosensor voltamperométrico monoenzimático de glucosa, la mejor fue aquella en la cual a la plataforma se le agrega la enzima y posteriormente el Nafion. El biosensor fue funcional ya que la enzima glucosa oxidasa transforma la glucosa en ácido glucónico, el cual disminuye el pH de la solución y la polidopamina detecta este cambio de pH. El biosensor es útil para tiempos de análisis cortos, sin embargo, en análisis largos tiene el inconveniente de que la enzima se puede perder en solución.

La plataforma voltamperométrica de pH fue útil para el desarrollo del biosensor voltamperométrico monoenzimático de glucosa. El biosensor es funcional.

De igual manera que en el biosensor de triglicéridos, la plataforma voltamperométrica construida en las dos condiciones óptimas (plataforma y biosensor de triglicéridos) fue funcional para el desarrollo del biosensor de glucosa. A partir de esto, se puede notar que la idea de construir una plataforma que, con pequeñas modificaciones adicionales, sirva para la cuantificación de diversos analitos es funcional. Además, no se requiere que el nuevo sensor a desarrollar se optimice, aunque si se desea hacerlo, las condiciones de construcción de la plataforma nos brindan información para elegir las condiciones a optimizar.

Como se ha visto, se realizaron diferentes configuraciones para la construcción del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos, algunas resultaron ser más efectivas y funcionales que otras, principalmente el que se construye a partir de la plataforma que se modifica con la enzima glucosa oxidasa y posteriormente se le adiciona la membrana de Nafion.

Capítulo IX: Conclusiones

Se evaluó el compartimento electroquímico del rojo de alizarina S y la dopamina en solución, encontrándose que la dopamina presenta las mejores características de respuesta, por lo que fue elegida para el desarrollo de la plataforma voltamperométrica de pH

A partir de estos resultados experimentales e información reportada en la literatura fue posible proponer un mecanismo integral y consistente de electropolimerización de la dopamina: $H_3DA^+ \xrightarrow{E} HDAQ^+ \xrightarrow{C} DAQ \xrightarrow{C} HLDAC^+ \xrightarrow{E} HDAC^+ \xrightarrow{C} HDHI^+ \xrightarrow{E} HIQ^+ \xrightarrow{C}$ polidopamina.

Se logró construir y optimizar una plataforma voltamperométrica de pH basada en un electrodo de carbón vítreo con una membrana de Nafion con polidopamina. Las condiciones óptimas de construcción fueron una concentración de dopamina 5 mM, 5 ciclos en un intervalo de -0.4 a y +1.3 V en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.

La plataforma voltamperométrica de pH es funcional para la medición del pH. Posee una sensibilidad de 61.0 mV/pH \pm 1.6 mV/pH en un amplio intervalo de pH de 0.5 a 13 con excelente repetitividad y reproducibilidad.

Se caracterizó la plataforma voltamperométrica de pH por voltamperometría, impedancia electroquímica, microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido y espectroscopia de infrarrojo. La polidopamina presenta tres señales electroquímicas, dos de reducción y una de oxidación, las cuales poseen un comportamiento nernstiano en un amplio intervalo de pH de 1 a 13. La modificación del electrodo de carbón vítreo con Nafion genera una superficie heterogénea pero una vez electropolimerizada la dopamina la superficie es homogénea. La plataforma presenta una resistencia cercana a la del electrodo de carbón vítreo. La oxidación electroquímica de la polidopamina se caracterizó por la aparición de la señal de carbonilo en el espectro de infrarrojo.

La plataforma voltamperométrica de pH se empleó con éxito como transductor para demostrar que es posible el desarrollo de un biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos y un biosensor voltamperométrico monoenzimático de glucosa y que la plataforma es funcional para el desarrollo de nuevos sensores electroquímicos.

El biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos demostró ser funcional para la cuantificación de triglicéridos en muestras de aceites comestibles. Es sencillo, asequible, económico y de fácil construcción.

Capítulo X: Perspectivas

Para el desarrollo del biosensor monoenzimático de glucosa se debe de buscar una estrategia para retener a la enzima glucosa oxidasa sobre la superficie del electrodo, para que este pueda ser empleado eficientemente en la cuantificación de glucosa. Se propone emplear glutaraldehído como agente entrecruzante para entrelazar las unidades de la glucosa oxidasa.

Considerando que la plataforma tuvo éxito en ser la base para el desarrollo del biosensor voltamperométrico monoenzimático de triglicéridos, se puede extender su uso para otros analitos, como la urea, incorporando para una muestra en particular los respectivos estudios de interferencias.

Capítulo XI: Referencias

- Affoune, A. M., Yamada, A. y Umeda, M. (2005). Conductivity and surface morphology of Nafion membrane in water and alcohol environments. *Journal of Power Sources*, 148, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2005.01.039>
- Amiri, M., Amalil, E., Nematollahzadeh, A., y Haneie, S. (2016). Poly-dopamine Films: Voltammetric Sensor for pH Monitoring. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 228, 53-58. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.012>
- Aquino-Binag, C. N., Kumar, N., y Lamb, R. N. (1996). Fabrication and Characterization of a Hydroquinone-Functionalized Polypyrrole Thin-Film pH Sensor. *Chemistry of Materials*, 8(11), 2579-2585. <https://doi.org/10.1021/cm9506114>
- Avolio, R., Grozdanov, A., Avella, M., Barton, J., Cocca, M., De Falco, F., Dimitrov, A. T., Errico, M. E., Fanjul-Bolado, P., Gentile, G., Paunovic, P., Ribotti, A. y Magni, P. (2022). Review of pH sensing materials from macro- to nano-scale: Recent developments and examples of seawater applications. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 52(6), 979-1021. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1843312>
- Bacil, R. P., Chen, L., Serrano, S. H. P., y Compton, R. G. (2020). Dopamine oxidation at gold electrodes: mechanism y kinetics near neutral pH. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 202(2), 607-614. DOI: <https://doi.org/10.1039/C9CP05527D>
- Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S. y Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase — An overview. *Biotechnology Advances*, 27, 489–501. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.003>
- Baranwal, J., Barse, B., Gatto, G., Broncova, G., y Kumar, A. (2022). Electrochemical Sensors and Their Applications: A Review. *Chemosensors*, 10(9), 363-384. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10090363>
- Bardea, A., Katz, E. y Willner, I. (2000). Biosensors with Amperometric Detection of Enzymatically Controlled pH-Changes. *Electroanalysis*, 12(10), 731-735. [https://doi.org/10.1002/1521-4109\(200006\)12:10<731::AID-ELAN731>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1521-4109(200006)12:10<731::AID-ELAN731>3.0.CO;2-6)
- Bashir, R., Hilt, J. Z., Elibol, O., Gupta, A. y Peppas, N. A. (2002). Micromechanical cantilever as an ultrasensitive pH microsensor. *Applied Physics Letters*, 81(16), 3091-3093. <https://doi.org/10.1063/1.1514825>
- Buenger, D., Topuz, F. y Groll, J. (2012). Hydrogels in sensing applications. *Progress in Polymer Science*, 37(12), 1678–1719. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.09.001>
- Carter, J. E., Johnson, J. H., y Bamke, D. M. (1982). Dopamine hydrochloride. En K. Florey (Ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances* (Vol. 11, 257-272). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(08\)60266-X](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(08)60266-X)

- Chaisiwamongkhol, K., Batchelor-McAuley, C., y Compton, R. G. (2017). Amperometric micro pH measurements in oxygenated saliva. *Analyst*, *142*(15), 2828-2835. <https://doi.org/10.1039/C7AN00809K>
- Chaisiwamongkhol, K., Batchelor-McAuley, C., y Compton, R. G. (2019). Optimising amperometric pH sensing in blood samples: an iridium oxide electrode for blood pH sensing. *Analyst*, *144*(4), 1386-1393. <https://doi.org/10.1039/C8AN02238K>
- Chang, R., y Goldsby, K. A. (2013). Química (Undécima ed.). México: McGraw-Hill Educación.
- Chen, C. T., Martin-Martinez, F. J., Jung, G. S. y Buehler, M. J. (2017). Polydopamine and eumelanin molecular structures investigated with *ab initio* calculations. *Chemical Science*, *8* (2), 1631-1641. <https://doi.org/10.1039/c6sc04692d>
- Cobb, S. J., Ayres, Z. J., Newton, M. E., y Macpherson, J. V. (2019). Deconvoluting surface-bound quinone proton coupled electron transfer in unbuffered solutions: towards a universal voltammetric pH electrode. *Journal of the American Chemical Society*, *141*(2), 1035–1044. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b11518>
- Consumidor, P. F. (Ed.). (2010). Estudio de calidad: aceites vegetales comestibles. *Revista del consumidor*, 36-48.
- Corona-Avendaño, S., Alarcón-Ángeles, G., Rosquete-Pin, G. A., Rojas-Hernández, A., Gutiérrez, A., Ramírez-Silva, M. T., Romero-Romo, M. y Palomar-Pardavé, M. (2007). New Insights on the Nature of the Chemical Species Involved during the Process of Dopamine Deprotonation in Aqueous Solution: Theoretical and Experimental Study. *Journal of Physical Chemistry B*, *111*(7), 1640-1647. <https://doi.org/10.1021/jp0637227>
- Cruz Aburto, Z. G. (2021). *Desarrollo de un biosensor monoenzimático para determinar triglicéridos basado en un transductor voltamperométrico de pH* [Tesis de maestría]. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Cruz Aburto, Z. G., Rodríguez Ávila, J. A., Páez Hernández, M. E., y Galán Vidal, C. A. (2020). Evaluación de un transductor amperométrico de pH para el desarrollo de biosensores monoenzimáticos de triglicéridos. *Innovaciones en Ciencia, Tecnología y Educación (ICTE)*, *4*(4), 170-175.
- Dai, C., Crawford, L. P., Song, P., Fisher, A. C., y Lawrence, N. S. (2015). A novel sensor based on electropolymerized substituted-phenols for pH detection in unbuffered systems. *RSC Advances*, *5*(126), 104048–104053. <https://doi.org/10.1039/C5RA22595G>
- Dawit M, Turbale M, Moges A., y Amare M (2020). Poly(alizarin red S) modified glassy carbon electrode for square wave adsorptive stripping voltammetric determination of metronidazole in tablet formulation. *PLoS ONE*, *15*(12): e0244115-e0244131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244115>

- De Levie, R. (2014). A pH centenary. *Electrochimica Acta*, 135, 604-639. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.04.006>
- Dreyer, D. R., Miller, D. J., Freeman, B. D., Paul, D. R., y Bielawski, C. W. (2012). Elucidating the Structure of Poly(dopamine). *Langmuir*, 28(15), 6428–6435. <https://doi.org/10.1021/la204831b>
- Farias E. A. O., Furtado, N. J. S., Macêdo, I. Y. L., Gil, E.S., Guimarães, F. F., Bastos, R. S., Rocha, J. A., Nunes, L. C. C., Luz, R. A. S., Eiras, C. (2021). Poly(Alizarin Red S) on pyrolytic graphite electrodes as a new multi-electronic system for sensing oxandrolone in urine. *Biosensors and Bioelectronics*, 185, 113234-113242. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113234>
- Fernandez, R. E., Hareesh, V., Bhattacharya, E. y Chadha, A. (2009). Comparison of a potentiometric and a micromechanical triglyceride biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(5), 1276–1280. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.07.054>
- Filik, H., Avan, A. A. y Mümin, Y. (2017). Simultaneous Electrochemical Determination of Caffeine and Vanillin by Using Poly(Alizarin Red S) Modified Glassy Carbon Electrode. *Food Analytical Methods*, 10, 31–40. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0545-z>
- Galdino, F. E., Smith, J. P., Kwamou, S. I., Kampouris, D. K., Iniesta, J., Smith, G. C., Bonacin, J. A. y Banks, C. E. (2015). Graphite Screen-Printed Electrodes Applied for the Accurate and Reagentless Sensing of pH. *Analytical Chemistry*, 87(23), 11666–11672. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01236>
- Galster, H. (1991). pH Measurement. Fundamental, Methods, Applications, Instrumentation. New York: VCH.
- Gao, W., y Song, J. (2009). Polyaniline Film Based Amperometric pH Sensor Using A Novel Electrochemical Measurement System. *Electroanalysis*, 21(8), 973-978. <https://doi.org/10.1002/elan.200804500>
- Gazulla, M. F., Rodrigo, M., Blasco, E. y Orduña, M. (2013). Nitrogen determination by SEM-EDS and elemental analysis. *X-Ray Spectrometry*, 42(5), 394-401 <https://doi.org/10.1002/xrs.2490>
- Ghoneim, M. T., Nguyen, A., Dereje, N., Huang, J., Moore, G. C., Murzynowski, P. J., y Dagdeviren, C. (2019). Recent Progress in Electrochemical pH-Sensing Materials and Configurations for Biomedical Applications. *Chemical Reviews*, 119(8), 5248–5297. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00655>
- Grijalva Canales, J., Galán Vidal, C. A., Rodríguez Ávila, J. A. y Páez Hernández, M. E. (22 de septiembre de 2022). Desarrollo de un sensor voltamperométrico de pH con base en una membrana de Nafion con rojo de alizarina S. [Presentación en modalidad cartel]. XXXIV Congreso Nacional de Química Analítica. Asociación Mexicana de Química Analítica. Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.
- Gruger, A., Régis, A., Schmatko, T., y Colomban, P. (2001). Nanostructure of Nafion® membranes at different states of hydration: An IR and Raman study.

- Vibrational Spectroscopy*, 26(2), 215-225. [https://doi.org/10.1016/S0924-2031\(01\)00116-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2031(01)00116-3)
- Güngör, Ö., Paşahan, A., Cengiz, M. A., Köytepe, S., y Seçkin, T. (2015). Fructose-Based Polyurethane Membranes: Synthesis, Characterization, and Their Use as Voltammetric pH Electrode. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 64(11), 563-569. <https://doi.org/10.1080/00914037.2014.996705>
 - Hatefi-Mehrjardi, A., Ghaemi, N., Karimi, M. A., Ghasemi, M., y Islami-Ramchahi, S. (2014). Poly-(Alizarin Red S)-Modified Glassy Carbon Electrode for Simultaneous Electrochemical Determination of Levodopa, Homovanillic Acid and Ascorbic Acid. *Electroanalysis*, 26(11), 2491-2500. <https://doi.org/10.1002/elan.201400302>
 - Huang, D-Q. Chen, C., Wu, Y-M, Zhang, H., Sheng, L-Q, Xu, H-J. y Liu, Z-D. (2012). The determination of dopamine using glassy carbon electrode pretreated by a simple electrochemical method. *International Journal of electrochemical science*, 7(6), 5510-5520. [https://doi.org/10.1016/S1452-3981\(23\)19638-6](https://doi.org/10.1016/S1452-3981(23)19638-6)
 - Indelicato, S., Bongiorno, D., Pitonzo, R., Stefano, V. D., Calabrese, V., Indelicato, S., y Avellone, G. (2017). Triacylglycerols (TAGs) in edible oils: determination, characterization, quantitation, chemometric approach and evaluation of adulterations. *Journal of Chromatography A*, 1515, 1-16. doi:<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.chroma.2017.08.002>
 - Ismail, I., Okajima, T., Kawauchi, S. y Ohsaka, T. (2016). Studies on the early oxidation process of dopamine by electrochemical measurements and quantum chemical calculations. *Electrochimica Acta*, 211, 777-786. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.05.056>
 - Jiang, J., Cao, Y., Liu, J., Zhang, H., Kan, G. y Yu, K. (2022). Mass spectrometric observation on free radicals during electrooxidation of dopamine. *Analytica Chimica Acta*, 1193, 339403-339409. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339403>
 - Karyakin, A. A., Lukachova, L. V., Karyakina, E. E., Orlov, A. V. y Karpachova, G. P. (1999a). The improved potentiometric pH response of electrodes modified with processible polyaniline. Application to glucose biosensor. *Analytical Communications*, 36, 153–156. <https://doi.org/10.1039/A900597H>
 - Karyakin, A. A., Vuki, M., Lukachova, L. V., Karyakina, E. E., Orlov, A. V., Karpachova, G. P. y Wang, J. (1999b). Processible polyaniline as an advanced potentiometric pH transducer. application to biosensors. *Analytical Communications*, 71(13), 2534–2540. <https://doi.org/10.1021/ac981337a>
 - Kawahara, R., Sahatiya, P., Badhulika, S. y Uno, S. (2018). Paper-based potentiometric pH sensor using carbon electrode drawn by pencil. *Japanese Journal of Applied Physics*, 57, 04FM08-1 - 04FM08-6. <https://doi.org/10.7567/JJAP.57.04FM08>

- Khan, M. I., Mukherjee, K., Shoukat, R., y Dong, H. (2017). A review on pH sensitive materials for sensors and detection methods. *Microsystem Technologies*, 23, 4391–4404. <https://doi.org/10.1007/s00542-017-3495-5>
- Khun, K., Ibupoto, Z. H., Lu, J., AlSalhi, M. S., Atif, M., Ansari, A. A., y Willander, M. (2012). Potentiometric glucose sensor based on the glucose oxidase immobilized iron ferrite magnetic particle/chitosan composite modified gold coated glass electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 173, 698–703. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.07.074>
- Kimmel, D. W., LeBlanc, G., Meschievitz, M. E., y Cliffel, D. E. (2012). Electrochemical Sensors and Biosensors. *Analytical Chemistry*, 84(2), 685–707. <https://doi.org/10.1021/ac202878q>
- Koncki, R., Glab, S., Kopczewsk, E., Walcer, I., y Hulanicki, A. (1994). Urea sensors based on PVC membrane pH electrode. *Talanta*, 41(7), 1201–1205. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(94\)80092-8](https://doi.org/10.1016/0039-9140(94)80092-8)
- Korostynska, O., Arshak, K., Gill, E., y Arshak, A. (2007). Review on State-of-the-art in Polymer Based pH Sensors. *Sensors*, 7(12), 3027–3042. <https://doi.org/10.3390/s7123027>
- Lad, U., Khokhar, S. y Kale, G. M. (2008). Electrochemical Creatinine Biosensors. *Analytical Chemistry*, 80(21), 7910–7917. <https://doi.org/10.1021/ac801500t>
- Lakard, B., Herlem, G., Lakard, S., Guyetant, R. y Fahys, B. (2005). Potentiometric pH sensors based on electrodeposited polymers. *Polymer*, 46(26), 12233–12239. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.10.095>
- Leventis, H. C., Streeter, I., Wildgoose, G. G., Lawrence, N. S., Jiang, L., Jones, T. G., y Compton, R. G. (2004). Derivatized carbon powder electrodes: reagentless pH sensors. *Talanta*, 63(4), 1039–1051. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.01.017>
- Li, D., Ao, K., Wang, Q., Lv, P. y Wei, Q. (2016). Preparation of Pd/Bacterial Cellulose Hybrid Nanofibers for Dopamine Detection. *Molecules*, 21(5), 618–628. <https://doi.org/10.3390/molecules21050618>
- Li, S., Wang, H., Young, M., Xu, F., Cheng, G. y Cong, H. (2019). Properties of Electropolymerized Dopamine and Its Analogues. *Langmuir*, 35(5), 1119–1125. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01444>
- Li, Y., Liu, M., Xiang, C., Xie, Q., y Yao, S. (2006). Electrochemical quartz crystal microbalance study on growth and property of the polymer deposit at gold electrodes during oxidation of dopamine in aqueous solutions. *Thin Solid Films*, 497(1-2), 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2005.10.048>
- Liang, Z., Chen, W., Liu, J., Wang, S., Zhou, Z., Li, W., Sun, G. y Xin, Q. (2004). FT-IR study of the microstructure of Nafion® membrane. *Journal of Membrane Science*, 233(1-2), 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2003.12.008>
- Lin, C., Chen, L., Tanner, E. E. L. y Compton R. G. (2017). Electroanalytical study of dopamine oxidation on carbon electrodes: from the macro- to the micro-scale.

- Physical Chemistry Chemical Physics*, 20(1), 148-157. <https://doi.org/10.1039/C7CP07450F>
- Lucio, A. J., y Macpherson, J. V. (2020). Combined Voltammetric Measurement of pH and Free Chlorine Speciation Using a Micro-Spot sp² Bonded Carbon–Boron Doped Diamond Electrode. *Analytical Chemistry*, 92(24), 16072–16078. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03692>
 - Ludvigsson, M., Lindgren, J., y Tegenfeldt, J. (2000). FTIR study of water in cast Nafion films. *Electrochimica Acta*, 45(14), 2267–2271. [https://doi.org/10.1016/S0013-4686\(99\)00438-7](https://doi.org/10.1016/S0013-4686(99)00438-7)
 - Lu, M., y Compton, R. G. (2014a). Voltammetric pH sensor based on an edge plane pyrolytic graphite electrode. *Analyst*, 139(10), 2397–2403. <https://doi.org/10.1039/C4AN00147H>
 - Lu, M., y Compton, R. G. (2014b). Voltammetric pH sensing using carbon electrodes: glassy carbon behaves similarly to EPPG. *Analyst*, 139(18), 4599–4605. <https://doi.org/10.1039/C4AN00866A>
 - Ma, C.-H., Yu, T. L., Lin, H.-Li., Huang, Y.-T., Chen, Y.-L., Jeng, U.-S., Lai, Y.-H. y Sun, Y.-S. (2009). Morphology and properties of Nafion membranes prepared by solution casting. *Polymer*, 50(7), 1764–1777. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2009.01.060>
 - Makos, M. A., Omiatek, D. M., Ewing, A. G., y Heien, M. L. (2010). Development and Characterization of a Voltammetric Carbon-Fiber Microelectrode pH Sensor. *Langmuir*, 26(12), 10386–10391. <https://doi.org/10.1021/la100134r>
 - Mandler, D., Kaminski, A., y Willner, I. (1992). Application of polyethyleneimine-quinone modified electrodes for voltammetric measurements of pH. *Electrochimica Acta*, 37(15), 2165-2761. [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(92\)85204-X](https://doi.org/10.1016/0013-4686(92)85204-X)
 - Marxer, S. M. y Schoenfisch, M. H. (2005). Sol-Gel Derived Potentiometric pH Sensors. *Analytical Chemistry*, 77(3), 848-853. <https://doi.org/10.1021/ac0486995>
 - Meyerhoff, M. E., Fraticell, V. M., Greenberg, J. A., Rosen, J., Parks, S. J., y Opdycke, W. N. (1982). Polymer-Membrane Electrode-Based Potentiometric Sensing of Ammonia and Carbon Dioxide in Physiological Fluids. *Clinical Chemistry*, 28(9), 1973-1978. <https://doi.org/10.1093/clinchem/28.9.1973>
 - Michalak, M., Kurel, M., Jedraszko, J., Toczydlowska, D., Wittstock, G., Opallo, M., y Nogala, W. (2015). Voltammetric pH Nanosensor. *Analytical Chemistry*, 87(23), 11641–11645. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03482>
 - Miyake, M. (2003). Chapter 26 - Electrochemical Functions. En E. Yasuda, M. Inagaki, K. Kaneko, M. Endo, A. Oya y Y. Tanabe (Eds), *Carbon Alloys Novel Concepts to Develop Carbon Science and Technology* (435-445). ELSEVIER. <https://doi.org/10.1016/B978-008044163-4/50026-7>
 - Muguruma, H., Inoue, Y., Inoue, H., y Ohsawa, T. (2016). Electrochemical Study of Dopamine at Electrode Fabricated by Cellulose-Assisted Aqueous Dispersion of

- Long-Length Carbon Nanotube. *Journal of Physical Chemistry C*, 120(22), 12284–12292. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b03715>
- Mümin, Y., Filik, H., Aydar, S., y Avan, A. A. (2016). Electrochemical Determination of Brucine in Urine with a Poly(Alizarin Red S)-modified Glassy Carbon Electrode. *Analytical Letters*, 49(17), 2716–2727. <https://doi.org/10.1080/00032719.2016.1154569>
 - Munteanu, R.-E., Stănică, L., Gheorghiu, M., y Gáspár, S. (2018). Measurement of the extracellular pH of adherently growing mammalian cells with high spatial resolution using a voltammetric pH microsensor. *Analytical Chemistry*, 90(11), 6899–6905. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01124>
 - Musa, A. E., Alonso-Lomillo, M. A., Del Campo, F. J., Abramova, N., Domínguez-Renedo, O., Arcos-Martínez, M. J., y Kutter, J. P. (2012). Thick-film voltammetric pH-sensors with internal indicator and reference species. *Talanta*, 99, 737–743. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.07.014>
 - Napoli, L., Franco, J., Fasoli, H. y Sanguinetti, A. (2014). Conductivity of Nafion® 117 membrane used in polymer electrolyte fuel cells. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(16), 8656–8660. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.12.066>
 - O’Dea, J. R., Economou, N. J. y Buratto, S. K. (2013). Surface Morphology of Nafion at Hydrated and Dehydrated Conditions. *Macromolecules*, 46(6), 2267–2274. <https://doi.org/10.1021/ma302399e>
 - Pan, X., Wang, H., Li, C., Zhang, J. Z. H. y Ji, C. (2021). MolGpka: A Web Server for Small Molecule pKa Prediction Using a Graph-Convolutional Neural Network. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61(7), 3159–3165. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c0007>
 - Park, W., y Kim, S. (2013). Triggerable single-component two-electrode voltammetric pH sensors using dyad molecules. *Electrochemistry Communications*, 26, 109–112. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2012.10.025>
 - Pisoschi, A. M. (2016). Potentiometric Biosensors: Concept and Analytical Applications-An Editorial. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 5(3), e164–e165. 10.4172/2161-1009.1000e164
 - Pizzariello, A., Stredanský, M., Stredanská, S. y Miertus, S. (2001). Urea biosensor based on amperometric pH-sensing with hematein as a pH-sensitive redox mediator. *Talanta*, 54(4), 763–772. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(01\)00331-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(01)00331-9)
 - Pöller, S. y Schuhmann, W. (2014). A miniaturized voltammetric pH sensor based on optimized redox polymers. *Electrochimica Acta*, 140, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.03.116>
 - Rabboh, F. M., y O’Neil, G. D. (2020). Voltammetric pH Measurements in Unadulterated Foodstuffs, Urine, and Serum with 3D-Printed Graphene/Poly(Lactic

- Acid) Electrodes. *Analytical Chemistry*, 92(22), 14999–15006. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02902>
- Raj, C. R., Okajima, T., y Ohsaka, T. (2002). Voltammetric measurement of pH using a mixed self-assembly of macrocyclic nickel(II) complex and diimine on gold electrode. *Electrochemistry Communications*, 4(4), 330–335. [https://doi.org/10.1016/S1388-2481\(02\)00303-X](https://doi.org/10.1016/S1388-2481(02)00303-X)
 - Reddaiah, K., Madhusudana Reddy, T., Venkata Ramana, D. K., y Subba Rao, Y. (2016). Poly-Alizarin red S/multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode for the boost up of electrocatalytic activity towards the investigation of dopamine and simultaneous resolution in the presence of 5-HT: A voltammetric study. *Materials Science and Engineering: C*, 62, 506-517. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.036>
 - Rojas Hernández, A. (1995). El método de especies y equilibrios generalizados para el estudio de sistemas químicos en equilibrio bajo condiciones de amortiguamiento: Teoría y algoritmos de los diagramas de zonas de predominio. [Tesis de doctorado] Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa.
 - Ruan, C., Zeng, K. y Grimes, C. A. (2003). A mass-sensitive pH sensor based on a stimuli-responsive polymer. *Analytica Chimica Acta*, 497(1-2), 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.08.051>
 - Rubinstein, I. (1984). Voltammetric pH Measurements with Surface-Modified Electrodes and a Voltammetric Internal Reference. *Analytical Chemistry*, 56(7), 1135-1137. <https://doi.org/10.1021/ac00271a018>
 - Saikrithika, S., y Kumar, A. S. (2021). A selective voltammetric pH sensor using graphitized mesoporous carbon/polyaniline hybrid system. *Journal of Chemical Sciences*, 133(46), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s12039-021-01908-3>
 - Sánchez-Rivera., A. E., Corona-Avenidaño, S., Alarcón-Angeles, G., Rojas-Hernández, A. Ramírez-Silva, M. T. y Romero-Romo, M. A. (2003). Spectrophotometric study on the stability of dopamine and the determination of its acidity constants. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 59(13), 3193-3203. [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(03\)00138-0](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(03)00138-0)
 - Salomäki, M., Marttila, L., Kivelä, H., Ouvinen, T. y Lukkari, J. (2018). Effects of pH and Oxidants on the First Steps of Polydopamine Formation: A Thermodynamic Approach. *The Journal of Physical Chemistry B*, 122(24), 6314–6327. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b02304>
 - Schindler, S., y Bechtold, T. (2019). Mechanistic insights into de electrochemical oxidation of dopamine by cyclic voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 836, 94-101. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.01.069>
 - Seki, A., Ikeda, S., Kubo, I. y Karube, I. (1998). Biosensors based on light-addressable potentiometric sensors for urea, penicillin and glucose, *Analytica Chimica Acta*, 373(1), 9-13. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00364-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00364-X)

- Sha, R., Komori, K. y Badhulika, S. (2017). Amperometric pH sensor based on Graphene-Polyaniline composite. *IEEE Sensors Journal*, 17(16), 5038–5043. [10.1109/JSEN.2017.2720634](https://doi.org/10.1109/JSEN.2017.2720634)
- Shim, J. H., Kang, M., Lee, Y y Lee, C. (2012). A nanoporous ruthenium oxide framework for amperometric sensing of glucose and potentiometric sensing of pH. *Microchim Acta*, 177, 211–219. <https://doi.org/10.1007/s00604-012-0774-9>
- Solanki, P. R., Dhand, C., Kaushik, A., Ansari, A. A., Sood, K. N. y Malhotra, B. D. (2009). Nanostructured cerium oxide film for triglyceride sensor. *Sensors and Actuators B*, 141(2), 551–556. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2009.05.034>
- Stredanský, M., Pizzariello, A., Stred'anská, S., y Miertuš, S. (2000). Amperometric pH-sensing biosensors for urea, penicillin, and oxalacetate. *Analytica Chimica Acta*, 415(1-2), 151–157. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)00869-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)00869-2)
- Tham, G. X., Fisher, A. C. y Webster, R. D. (2019). A vitamin-based voltammetric pH sensor that functions in buffered and unbuffered media. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 283, 495–503. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.12.036>
- Trejo Córdova, G., Rojas Hernández, A., Ramírez Silva, M. T. (1993). Diagramas de zonas de predominio aplicados al Análisis Químico. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
- Vijayalakshmi, A., Tarunashree, Y., Baruwati, B., Manorama, S. V., Narayana, B. L., Johnson, R. E. C. y Rao, N. M. (2008). Enzyme field effect transistor (ENFET) for estimation of triglycerides using magnetic nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(11), 1708–1714. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.02.003>
- Vivaldi, F., Salvo, P., Poma, N., Bonini, A., Biagini, D., Del Noce, L., Melai, B., Lisi, F. y Di Francesco, F. (2021). Recent Advances in Optical, Electrochemical and Field Effect pH Sensors. *Chemosensors*, 9(2), 33. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9020033>
- Vivaldi, F., Santalucia, D., Poma, N., Bonini, A., Salvo, P., Del Noce, L., Melai, B., Kirchhain, A., Kolivoška, V., Sokolová, R., Hromadová, M. y Di Francesco, F. (2020). A voltammetric pH sensor for food and biological matrices. *Sensors and Actuators: B. Chemical*, 322, 128650. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128650>
- Vostiar, I., Tkac, J., Sturdik, E. y Gemeiner, P. (2002). Amperometric urea biosensor based on urease and electropolymerized toluidine blue dye as a pH-sensitive redox probe. *Bioelectrochemistry*, 56(1-2), 113– 115. [https://doi.org/10.1016/S1567-5394\(02\)00042-7](https://doi.org/10.1016/S1567-5394(02)00042-7)
- Wu, C., Liu, X., Li, Y., Du, X., Wang, X. y Xu, P. (2014). Lipase-nanoporous gold biocomposite modified electrode for reliable detection of triglycerides. *Biosensors and Bioelectronics*, 53, 26–30. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.09.040>
- Young, T. E. y Babbitt, B. W. (1983). Electrochemical study of the oxidation of alpha-methyldopamine, alpha-methylnoradrenaline, and dopamine. *Journal of Organic Chemistry*, 48(4), 562–566. <https://doi.org/10.1021/jo00152a029>

- Yuqing, M., Jianrong, C., y Keming, F. (2005). New technology for the detection of pH. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 63(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.02.001>
- Zhang, Q., Pan, D., Zhang, H., Han, H., y Kang, Q. (2014a). Development of a poly(alizarin red S)/ionic liquid film modified electrode for voltammetric determination of catechol. *Electrochimica Acta*, 133, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.03.189>
- Zhang, W., Tang, Y., Liu, J., Ma, Y., Jiang, L., Huang, W., Huo, F. y Tian, D. (2014b). An electrochemical sensor for detecting triglyceride based on biomimetic polydopamine and gold nanocomposite. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(48), 8490–8495. <https://doi.org/10.1039/C4TB01439A>
- Zhang, X-P., Sun, W., Cao, S-H., Jiang, W-L., Peng, H., Cai, S-H. y Chen, Z. (2020). NMR Spectroelectrochemistry in Studies of Dopamine Oxidation. *Electrochemistry*, 88(3), 200–204. <https://doi.org/10.5796/electrochemistry.19-00083>
- Zhao, F., Wang, F., Zhao, W., Zhou, J., Liu, Y., Zou, L. y Ye, B. (2011). Voltammetric sensor for caffeine based on a glassy carbon electrode modified with Nafion and graphene oxide. *Microchim Acta*, 174, 383–390 <https://doi.org/10.1007/s00604-011-0635-y>
- Zhu, H., Hassan, T., Kabir, H., May, J., Hamal, K., Lopez, R., Smith, H. J., Nicholas, N. W., Sankaran, P., McIlroy, D. N. y Cheng, I. F. (2020). Voltammetric pH Sensor Based on Electrochemically Modified Pseudo-Graphite. *Analyst*, 125(22), 7252–7259. <https://doi.org/10.1039/D0AN01405B>
- Zittel, H. E. y Florence, T. M. (1967). Voltammetric and Spectrophotometric Study of the Zirconium-Alizarin Red S Complex. *Analytical Chemistry*, 39(3), 320–326 <https://doi.org/10.1021/ac60247a031>
- Zuliani, C., Matzeu, G. y Diamond, D. (2014). A potentiometric disposable sensor strip for measuring pH in saliva. *Electrochimica Acta*, 132, 292–296. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2014.03.140>

Capítulo XII: Anexos

9.1 Anexo 1: Valores de pKa de las especies involucradas en la oxidación de la H₃DA⁺

En la tabla A1.1 se presentan los valores de pka de las especies involucradas en la oxidación de la H₃DA⁺.

Tabla A1.1: Valores de pKa de las especies involucradas en la oxidación de la H₃DA⁺.

pKa	Especies					
	H ₃ DA ⁺	HDAQ ⁺	H ₃ LDAC ⁺	HDAC ⁺	H ₃ DHI ⁺	HIQ ⁺
pKa ₁	9.05	9.58	9.9	10.2	9.7	8.5
pKa ₂	10.58		10.0		9.8	
pKa ₃	12.07		12.9		13.3	
Referencia	Sánchez-Rivera et. al. (2003)	Young y Babbitt, (1983)	Obtenidos empleando el programa Molgpka			

H₃DA⁺: Dopamina; HDAQ⁺: Dopaminoquinona; H₃LDAC⁺: Leucodopaminocromo; HDAC⁺: Dopaminocromo; H₃DHI⁺: 5,6-dihidroxiindol; HIQ⁺: 5,6-indolquinona.

9.2 Anexo 2: Optimización de la plataforma voltamperométrica

Anexo 2.1: Optimización de la señal C en niveles bajos de los factores de construcción de la plataforma voltamperométrica

En la tabla A2.1 se presenta el diseño de experimentos para la optimización de la plataforma voltamperométrica de pH (electropolimerización de dopamina) y en la tabla A2.2 se muestran los resultados, donde las mejores condiciones para obtener la mayor sensibilidad en la curva de potencial contra pH son: 3 mM Dopamina, 3 ciclos, en el intervalo de -0.4 a +1.3 V (Fig. A2.1a).

Estas condiciones no se emplearon para la construcción de la plataforma voltamperométrica ya que la señal C se desdoblaba en dos señales (Fig. A2.1b) lo que hace difícil la medición del pH y la linealidad en la curva potencial contra pH disminuyó (Fig. A2.1c).

Tabla A2.1 Diseño de experimentos Taguchi L₉ (3³) para la optimización de la señal C en niveles bajos

Niveles	Factores		
	A: Concentración de dopamina (mM)	B: Número de ciclos	C: Intervalo de potencial (V)
1	1	3	[-0.4 a +1.3]
2	3	4	[-0.4 a +1.4]
3	5	5	[-0.4 a +1.5]

Tabla A2.2 Resultados del diseño de experimentos Taguchi L₉ (3³) para la optimización de la señal C en niveles bajos

Experimento	Factores			Respuesta
	A: Concentración de dopamina (mM)	B: Número de ciclos	C: Intervalo de potencial (V)	Sensibilidad (mV/pH)
3	1	3	-0.4 a + 1.3V	62.2
7	1	4	-0.4 a + 1.4V	54.6
5	1	5	-0.4 a + 1.5V	54.5
8	3	3	-0.4 a + 1.4V	59.9
1	3	4	-0.4 a + 1.5V	59.6
9	3	5	-0.4 a + 1.3V	60.3
6	5	3	-0.4 a + 1.5V	59.6
2	5	4	-0.4 a + 1.3V	58.7
4	5	5	-0.4 a + 1.4V	59.1

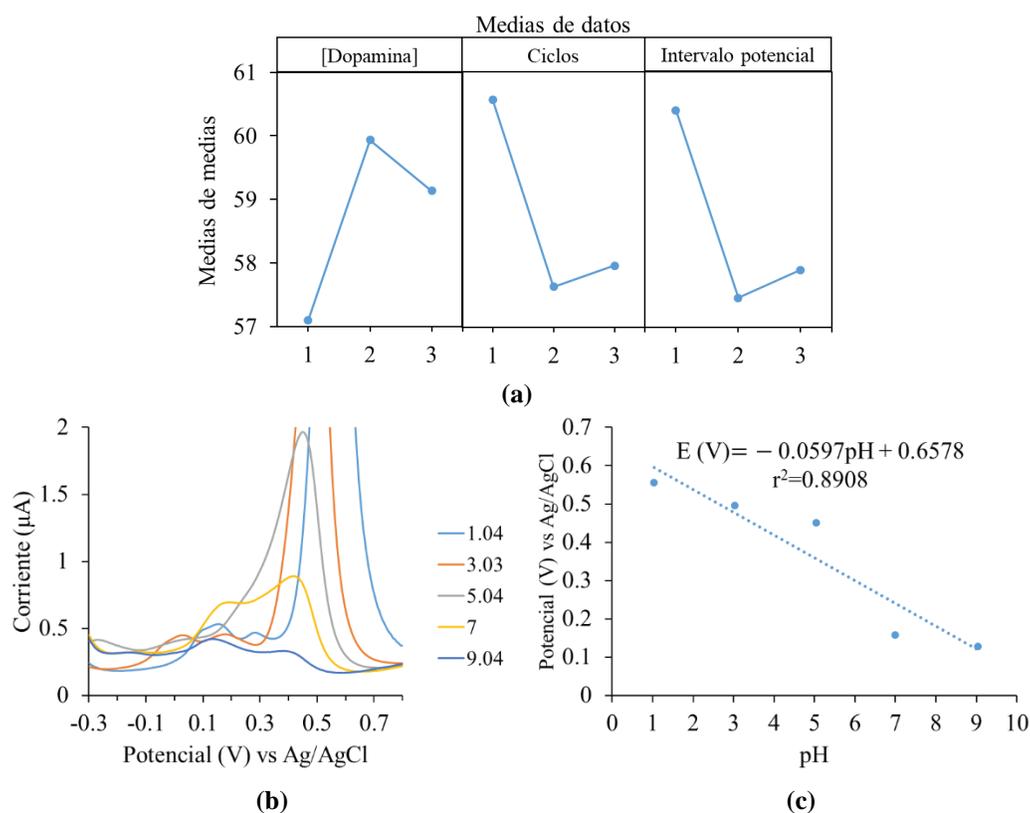


Figura A2.1 Optimización de la señal C en niveles bajos. a) Grafica de efectos principales para medias. b) Voltamperogramas diferenciales de pulso en las condiciones óptimas. c) Curva de calibrado potencial contra pH en las condiciones óptimas.

Anexo 2.2: Optimización de la señal A en niveles bajos de los factores de construcción de la plataforma voltamperométrica

En la tabla A2.3 se presenta el diseño de experimentos para la optimización de la señal A, mientras que en la tabla A2.4 se presentan los resultados de este diseño. Las mejores

condiciones para obtener una mayor sensibilidad en la curva potencial contra pH son: dopamina 1 mM, 3 ciclos y un intervalo de -0.4 V a +1.5 V (Fig. A2.2a), en las cuales se observó una mejoría en el valor de la sensibilidad (Fig. A2.2b).

Tabla A2.3 Diseño de experimentos Taguchi L₉ (3³) para la optimización de la señal A en niveles bajos

Niveles	Factores		
	A: Concentración de dopamina (mM)	B: Número de ciclos	C: Intervalo de potencial (V)
1	1	3	[-0.4 a +1.3]
2	3	4	[-0.4 a +1.4]
3	5	5	[-0.4 a +1.5]

Tabla A2.4 Resultados del diseño de experimentos Taguchi L₉ (3³) para la optimización de la señal A en niveles bajos

Experimento	Factores			Sensibilidad (mV/pH)
	A: Concentración de dopamina (mM)	B: Número de ciclos	C: Intervalo de potencial	
3	1	3	-0.4 a + 1.3V	75.4
7	1	4	-0.4 a + 1.4V	74.9
5	1	5	-0.4 a + 1.5V	77.0
8	3	3	-0.4 a + 1.4V	74.4
1	3	4	-0.4 a + 1.5V	75.9
9	3	5	-0.4 a + 1.3V	71.3
6	5	3	-0.4 a + 1.5V	74.8
2	5	4	-0.4 a + 1.3V	72.3
4	5	5	-0.4 a + 1.4V	75.2

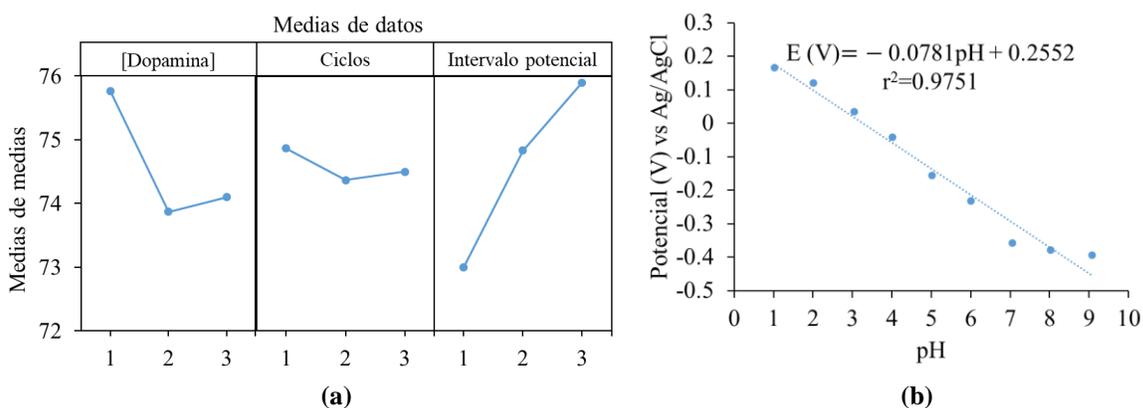


Figura A2.2 Optimización de la señal A en niveles bajos. a) Gráfica de efectos principales para medias. b) Curva de calibración de potencial contra pH para la señal A en las condiciones optimizadas.

Anexo 2.3: Optimización de la señal A en niveles altos de los factores de construcción de la plataforma voltamperométrica

En la tabla A2.5 se presenta el diseño de experimentos para la optimización de la señal A, en niveles altos mientras que en la tabla A2.6 se presentan los resultados de este diseño. Las mejores condiciones para obtener la mayor sensibilidad en la curva potencial contra pH son: dopamina 10 mM, 15 ciclos de -0.4 a +1.4 V (Fig. A2.3a), en las cuales se observó una mejoría en el valor de la sensibilidad (Fig. A2.3b).

Tabla A2.5 Diseño de experimentos Taguchi L₉ (3³) para la optimización de la señal A en niveles altos.

Niveles	Factores		
	A: Concentración de dopamina (mM)	B: Número de ciclos	C: Intervalo de potencial (V)
1	5	5	[-0.4 a +1.3]
2	7.5	10	[-0.4 a +1.4]
3	10	15	[-0.4 a +1.5]

Tabla A2.6 Resultados del diseño de experimentos Taguchi L₉ (3³) para la optimización de la señal A en niveles altos.

Experimento	Factores			Respuesta
	A: Concentración de dopamina (mM)	B: Número de ciclos	C: Intervalo de potencial (V)	Sensibilidad (mV/pH)
2	5	5	-0.4 a + 1.3V	72.7
4	5	10	-0.4 a + 1.4V	72.1
8	5	15	-0.4 a + 1.5V	75.5
5	7.5	5	-0.4 a + 1.4V	75.2
9	7.5	10	-0.4 a + 1.5V	72.9
7	7.5	15	-0.4 a + 1.3V	71.0
1	10	5	-0.4 a + 1.5V	77.6
6	10	10	-0.4 a + 1.3V	69.8
3	10	15	-0.4 a + 1.4V	97.0

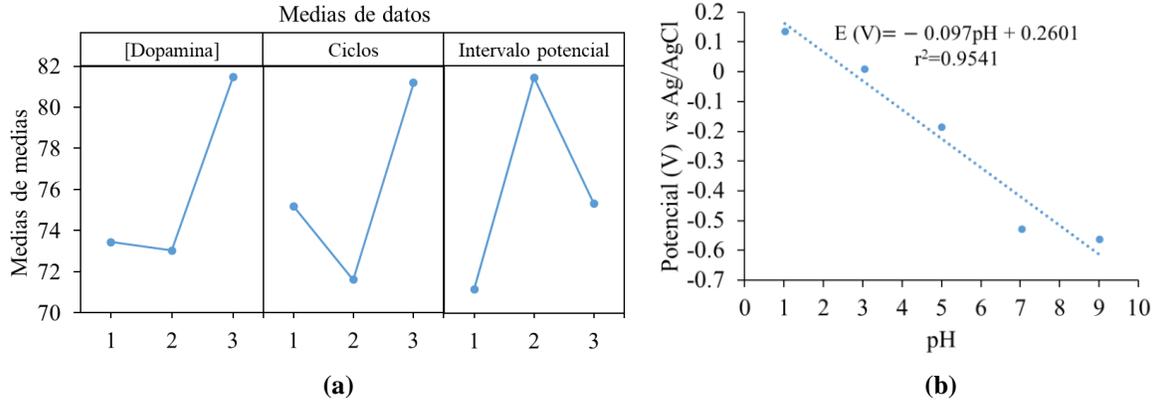


Figura A2.3 Optimización de la señal A en niveles altos. a) Gráfica de efectos principales para medias. b) Curva de calibración de potencial contra pH para la señal A en las condiciones optimizadas.

9.3 Anexo 3: Cálculos para la cuantificación de triglicéridos

Para la cuantificación de triglicéridos es importante contar con el voltamperograma base antes de añadir la muestra y realizar la curva de adición patrón. Para la cuantificación se realizaron 4 adiciones del estándar después de la adición de la muestra (Tabla A3.1). Para cuantificar los triglicéridos se requiere de graficar el potencial (P') contra la propiedad X'.

Tabla A3.1 Datos obtenidos en la cuantificación de triglicéridos

Adición	Potencial (V)	Concentración del estándar Tributirina (M)
(Sin adición)	Potencial base	-
Muestra	Potencial muestra	0.0000
1	Potencial adición 1	0.1650
2	Potencial adición 2	0.3289
3	Potencial adición 3	0.4910
4	Potencial adición 4	0.6504

Para trazar la gráfica P' contra la propiedad X'. Primero se calcula el factor de concentración FC:

$$FC = \left(\frac{V_0 + V_P + V_S}{V_0 + V_P} \right)$$

Dónde: FC=Factor de concentración

V_0 = Volumen inicial (ml)

V_P = Volumen agregado de muestra (ml)

V_S = Volumen agregado del estándar (ml)

Posteriormente se realiza la diferencia de potencial medido en las adiciones con el potencial base (sin adición) (Tabla A3.2). Este potencial ajustado se denota con la letra P. Para obtener P' se multiplica P por el FC para cada adición:

$$P' = P \left(\frac{V_0 + V_P + V_S}{V_0 + V_P} \right)$$

$$P' = P(FC)$$

Dónde: P = potencial ajustado

V_0 = Volumen inicial (ml)

V_P = Volumen agregado de muestra (ml)

V_S = Volumen agregado del estándar (ml)

Tabla A3.2 Cálculos para la cuantificación de triglicéridos

Adición	Concentración del estándar Tributirina (M)	Volumen adicionado del estándar V_S (ml)	Factor de Concentración (FC)	Potencial ajustado (P)	P'	X'
Muestra (0.1ml)	0.0000	0	FC ₁	P ₁	P' ₁	X' ₁
1	0.1650	0.02	FC ₂	P ₂	P' ₂	X' ₂
2	0.3289	0.04	FC ₃	P ₃	P' ₃	X' ₃
3	0.4910	0.06	FC ₄	P ₄	P' ₄	X' ₄
4	0.6504	0.08	FC ₅	P ₅	P' ₅	X' ₅

Para obtener a X' se sigue lo siguiente:

$$P' = kC'$$

Donde C' es:

$$C' = \left(\frac{V_P C_P + V_S C_S}{V_0 + V_P} \right)$$

Se sustituye C' en $P' = kC'$

$$P' = k \left(\frac{V_P C_P + V_S C_S}{V_0 + V_P} \right)$$

$$P' = \frac{k(V_P C_P)}{(V_0 + V_P)} + \frac{k(V_S C_S)}{(V_0 + V_P)}$$

Reordenando para tener la forma ecuación de la recta

$$P' = \frac{k(V_S C_S)}{(V_0 + V_P)} + \frac{k(V_P C_P)}{(V_0 + V_P)}$$

$$y = mx + b$$

$$m = k ; b = \frac{k(V_P C_P)}{(V_0 + V_P)} \text{ y } X' = \frac{(V_S C_S)}{(V_0 + V_P)}$$

Donde: V_0 = Volumen inicial (ml)

V_P = Volumen agregado de muestra (ml)

V_S = Volumen agregado del estándar (ml)

C_S = Concentración del estándar (tributirina) (M)

C_P = Concentración de triglicéridos (M)

Una vez calculados los valores de P' y X' se traza la curva P' contra X'

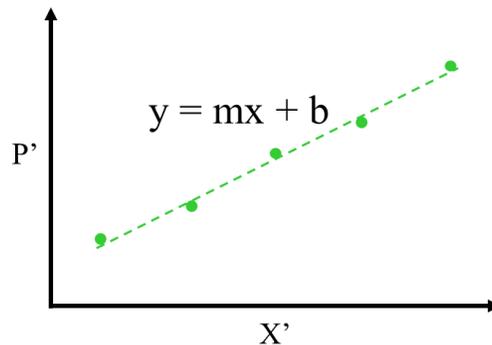


Figura A3.1. Gráfica P' contra X' para la cuantificación de triglicéridos.

Para calcular la concentración de triglicéridos (M) en el volumen agregado de muestra se calcula C_P :

$$C_P = \frac{b(V_0 + V_P)}{mV_P}$$

Dónde: m es la pendiente y b es la ordenada al origen de la curva P' contra X' .

V_0 = Volumen inicial (ml)

V_P = Volumen agregado de muestra (ml)

V_S = Volumen agregado del estándar (ml)

Debido a que los 200 μ L de aceite que se tomaron de muestra se diluyeron a 10 ml se realiza un cálculo de dilución para tener la concentración de triglicéridos en el aceite.

$$C_{\text{Triglicéridos en aceite}} = \frac{C_p(V_D)}{V_A}$$

Dónde: C_p = Concentración de triglicéridos obtenida en el análisis (M)

V_D = Volumen de dilución (ml)

V_A = Volumen de aceite tomado (ml)