

28

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MÉXICO



FACULTAD DE QUIMICA

“ DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE PROTOTIPOS DE  
SISTEMAS MICROBIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS  
SELECTIVOS A PERÓXIDO DE HIDROGENO (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ”

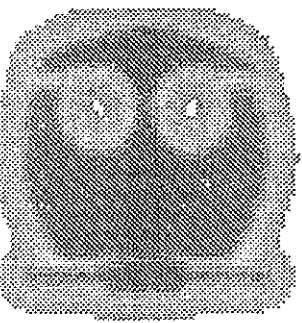
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

291796

PRESENTA

NATALIA ROSARIO CRUZ MARTINEZ



MEXICO, D. F.

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Jurado asignado:**

|                   |  |
|-------------------|--|
| Presidente:       | Profra. María Paz Adelina Pasos González |
| Vocal:            | Profra. Rebeca Ugalde Vargas             |
| Secretario:       | Prof. José Alejandro Baeza Reyes         |
| Primer suplente:  | Profra. Georgina Artemisa Duarte Lisci   |
| Segundo suplente: | Profra. Araceli García Ac                |

**Sitio donde se desarrollo el tema:**

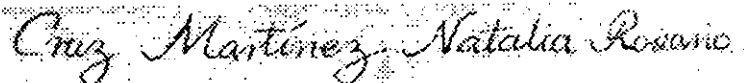
Laboratorio de Electroquímica analítica. Investigación y Enseñanza Experimental.  
División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química. UNAM

**Asesor**

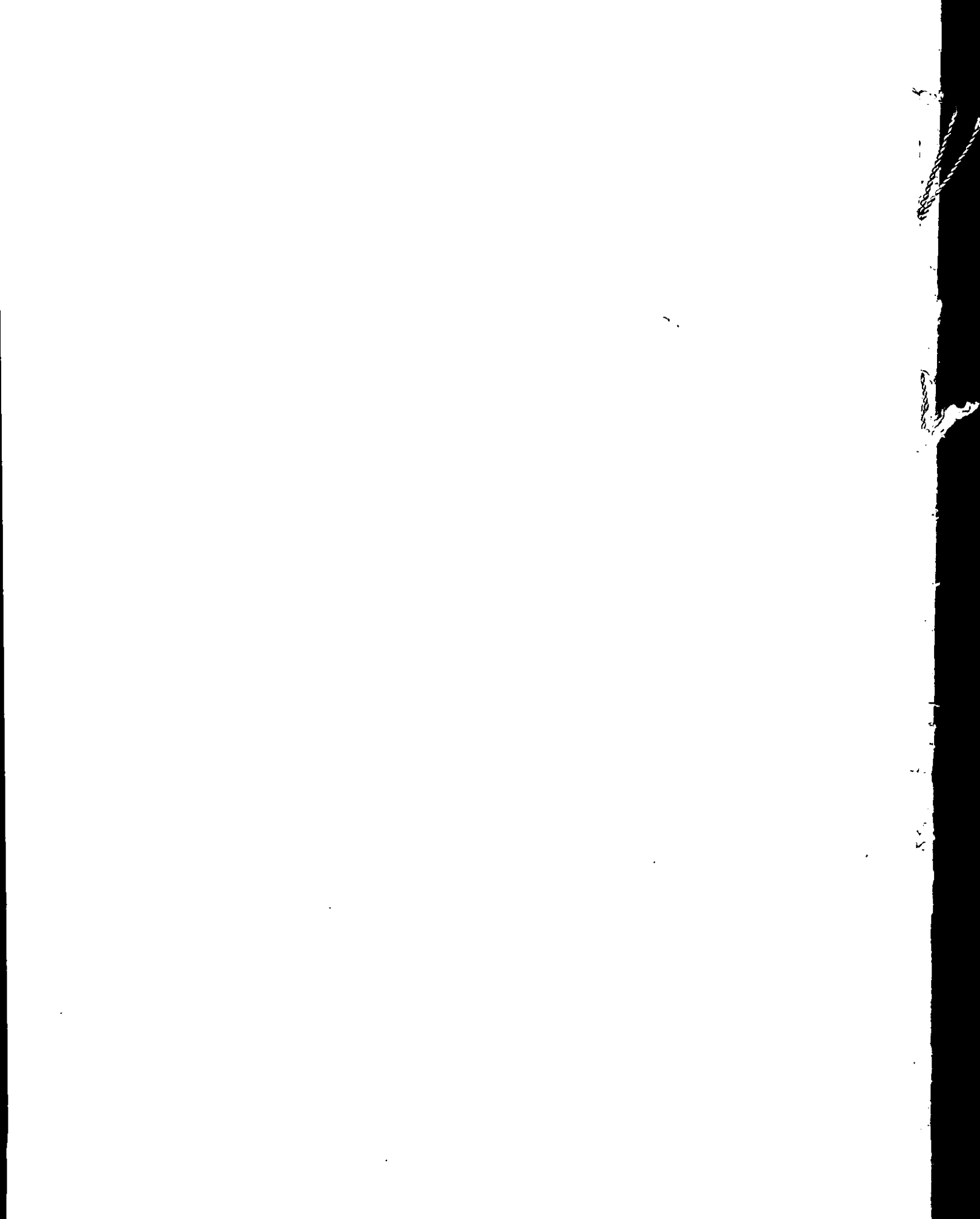


Dr. José Alejandro Baeza Reyes

**Sustentante**



Natalia Rosario Cruz Martínez



**Vientos Cósmicos**

**Vientos cósmicos y caminos siderales, mar de espejos cambiantes de colores, espectros pálidos, luceros melancólicos, poderosas novae inicio de la vida, vías lácteas derraman sus fulgores.**

**Camino de plumas, sendero de Dios, perlas y esmeraldas y zafiros, árboles de ensueño, manantial de colores, orgullosos pavos reales, encuentro de los dioses, escalera de marfil, troncos de flores, vapores inertes, rocío de fulgores.**

**Viaje pausado y lento, camino sin prisa y sin temores, ropaje y sedas, prismas, pegasos y musas soñadoras, tiempo que nunca se acaba prisa por encontrar tu trono, poderosos rayos que iluminan, mi viaje eterno que termina.**

**La búsqueda de Dios, esencia fina ;Voltea Señor ;,**

**Luz Divina, atraviesa mi pecho, iryecta Señor**

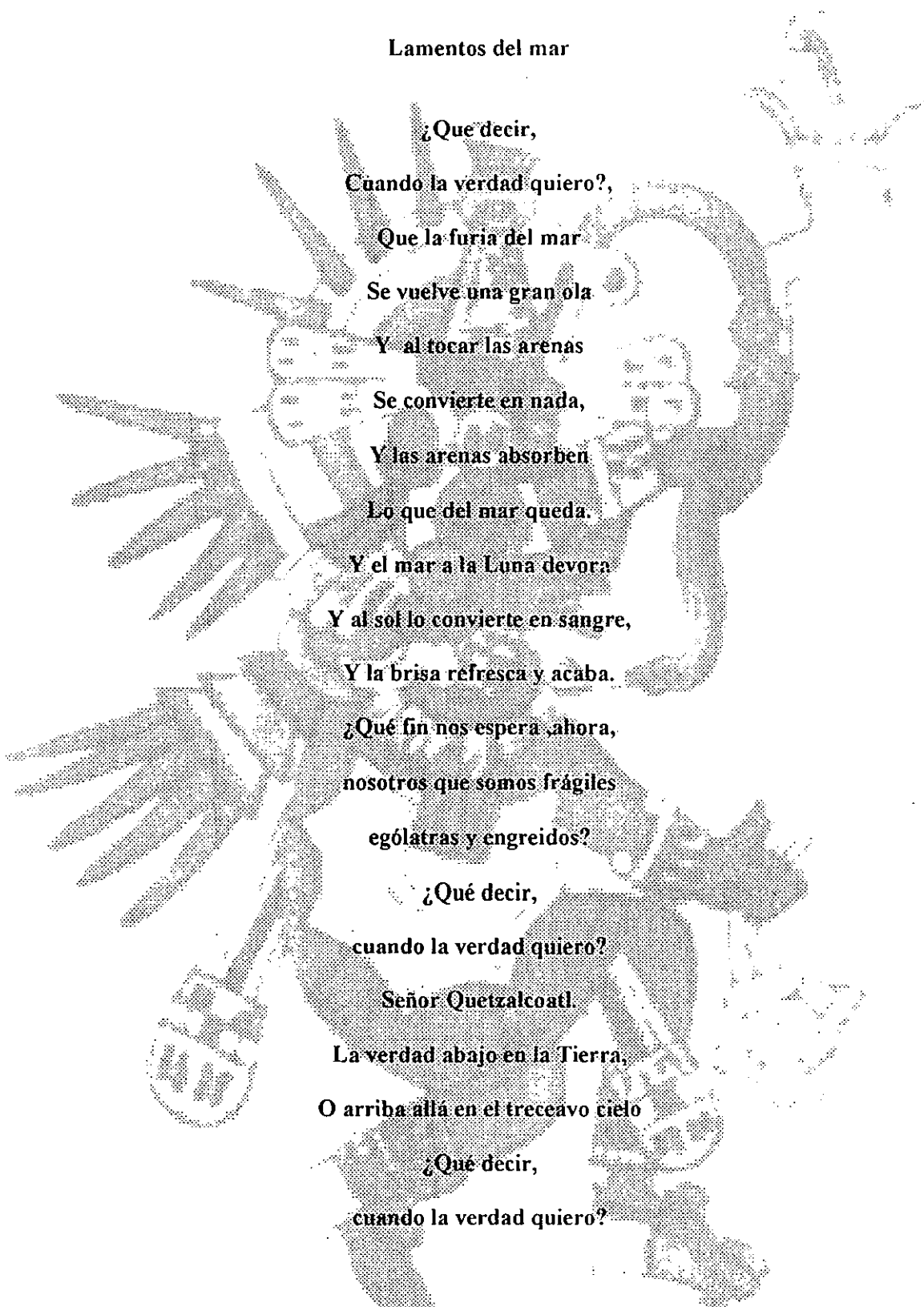
**; Sabiduria ; Dame Luz y Entendimiento,**

**apacienta Señor tus luceros,**

**; Dale Paz y Armonia a tu Universo;**

**Tío Alejandro.**

Lamentos del mar



¿Qué decir,  
Cuando la verdad quiero?,  
Que la furia del mar  
Se vuelve una gran ola  
Y al tocar las arenas  
Se convierte en nada,  
Y las arenas absorben  
Lo que del mar queda.  
Y el mar a la Luna devora  
Y al sol lo convierte en sangre,  
Y la brisa refresca y acaba.  
¿Qué fin nos espera ahora,  
nosotros que somos frágiles  
ególatras y engreidos?  
¿Qué decir,  
cuando la verdad quiero?  
Señor Quetzalcoatl.  
La verdad abajo en la Tierra,  
O arriba allá en el treceavo cielo  
¿Qué decir,  
cuando la verdad quiero?

Tío Alejandro.

## Agradecimientos

Al Ser, cuyo misterio aún no comprendo.

A Dios, a quien pido el camino de caminos.

A mi familia, aquella que fue inseparable y a mis ancestros de gloriosa cultura, pensamientos y metas ejemplares.

A la comunidad rebelde y con conciencia social de la UNAM

A mi asesor de tesis, aunque me confunda y no siempre me estime.

A mis amigos presentes y lejanos, especialmente a los artistas que me permitieron usar sus obras de arte en este trabajo.

A mis enemigos que algún día, serán mis amigos ( al menos, en otra vida )

*Natalia Rosario Cruz Martínez.*

*Reconocimiento especial a mi madre, la  
Señora Carmen Martínez González.*

**Mujer de Luz, que me diste la Luz.**

**Las palabras se quedan cortas,  
mi abrazo o mi beso no logran decir lo que  
quiero.**

**Hoy te doy tu lugar y tu reconocimiento.**

**Si otros no lo vieron, yo lo veo ahora.**

**Si otros no lo hablaron, yo lo digo ahora.**

**Mujer de acero, ganadora de todas las  
batallas, de todas.**

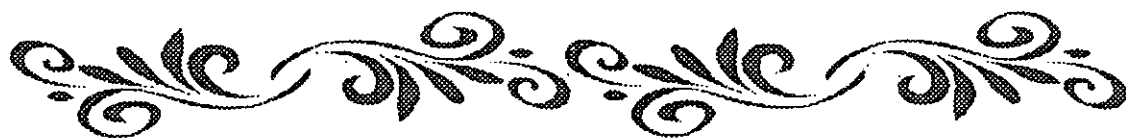
**Tu me has mostrado que el amor de Dios  
en la Tierra,**

**es el amor de una madre.**

**Gracias por todo tu tiempo y amor.**

*Natalia Rosario Cruz Martínez*





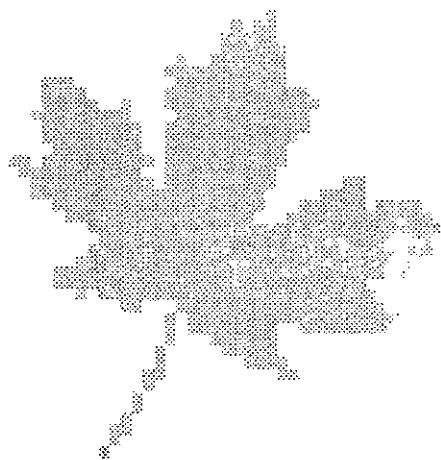
**DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE PROTOTIPOS**

**DE SISTEMAS MICROBIOSENSORES**

**ELECTROQUÍMICOS SELECTIVOS A**

**PERÓXIDO DE HIDRÓGENO ( $H_2O_2$ )**





## Índice

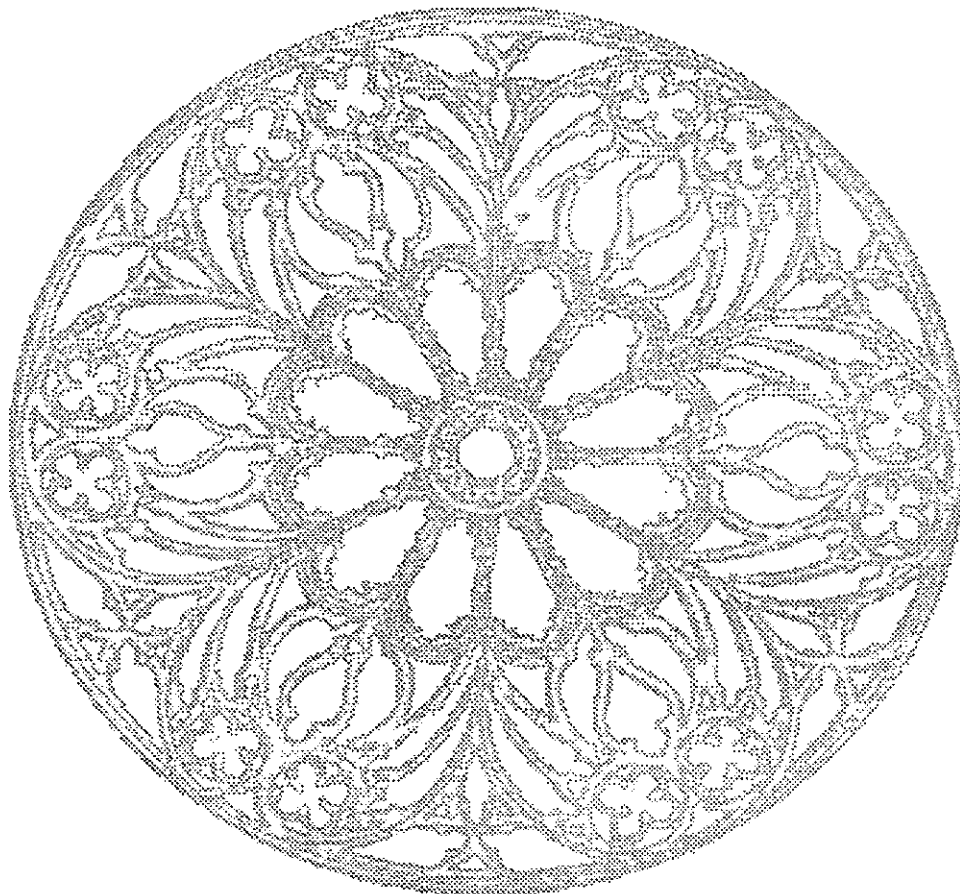
---

|   |     |
|---|-----|
| Prólogo .....   | iii |
| Abreviaturas .....  | v   |
| Resumen .....   | 9   |
| Abstract .....  | 12  |
| 1. Introducción .....   | 14  |
| 2. Antecedentes .....   | 19  |
| 2.1 Breve reseña de biosensores .....                         | 19  |
| 2.2 Clasificación de los biosensores .....                    | 21  |
| 2.2.a.1. Biosensores con transductores potenciométricos ..... | 21  |
| 2.2.a.2. Biosensores con transductores amperométricos .....   | 21  |
| 2.2.a.3. Biosensores con transductores conductimétricos ..... | 22  |

|   |    |
|---|----|
| 2.2.a.4. Biosensores con transductores térmicos .....   | 22 |
| 2.2.a.5. Biosensores con transductores ópticos .....  | 22 |
| 2.2.b.1. Biosensores enzimáticos convencionales .....   | 22 |
| 2.2.b.2. Biosensores que integran mediadores electrónicos .....   | 23 |
| 2.2.b.3. Biosensores basados en la competición enzimática .....   | 23 |
| 2.2.b.4. Inmunobiosensores que utilizan lisis de células<br>o liposomas mediada vía complemento .....   | 23 |
| 2.2.b.5. Biosensores basados en bioafinidad .....   | 23 |
| 2.2.b.6. Biosensores basados en células o tejidos completos .....   | 23 |
| 2.3 La miniaturización en sistemas biosensores .....  | 24 |
| 2.4 Importancia de la determinación de peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) como<br>analito y en sistemas biosensores electroquímicos ..... | 25 |
| 2.5 Biosensores selectivos a peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) basados en la<br>inmovilización de enzimas peroxidasas .....              | 27 |
| 2.5.a. Biosensores elaborados con electrodos modificados con<br>mediadores electrónicos y la enzima peroxidasa pura .....                                     | 27 |
| 2.5.b. Biosensores basados en polímeros electroactivos y la enzima<br>peroxidasa pura .....   | 27 |
| 2.5.c. Biosensores a base de composites modificados y la enzima<br>peroxidasa pura .....  | 27 |
| 2.5.d. Biosensores basados en electrodos de pasta de carbón y la<br>enzima peroxidasa pura o integrada en un tejido particular.....                           | 28 |
| 3. Objetivos .....  | 32 |
| 4. Desarrollo experimental .....  | 34 |

|  |    |
|--|----|
| 4.1. Determinación de la concentración de peróxido de hidrógeno ( H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , marca "Alcomex" ) de la muestra problema mediante el método tradicional de la volumetría ..... | 34 |
| 4.2. Preparación de estándares y problemas .....   | 34 |
| 4.3. Fabricación y montaje de la unidad miniaturizada con el biosensor combinado .....   | 35 |
| 4.3.1. Biosensor elaborado <b>con tejido fresco de papa</b> y alambre de acero inoxidable como transductor.....  | 35 |
| 4.3.2. Biosensor elaborado <b>con extracto acuoso crudo de papa</b> y alambre de acero inoxidable como transductor .....   | 36 |
| 4.3.3. Biosensor elaborado <b>con una solución concentrada de catalasa pura comercial</b> y utilizando como transductor alambre de acero inoxidable como transductor .....                       | 37 |
| 4.3.4. Miniaturización del biosensor combinado.....  | 39 |
| 4.3.4.1. Electrodo de referencia .....   | 39 |
| 4.3.4.2. Primer prototipo miniaturizado .....  | 40 |
| 4.3.4.3. Segundo prototipo miniaturizado .....   | 41 |
| 4.3.4.4. Tercer prototipo miniaturizado .....  | 43 |
| 4.4. Respuesta del biosensor .....   | 44 |
| 5. Metodología de procesamiento de datos .....   | 48 |
| 6. Resultados experimentales .....   | 50 |
| 6.1. Biosensor con tejido fresco de papa .....   | 50 |
| 6.2. Biosensor con extracto acuoso de papa cruda .....   | 54 |
| 6.3. Biosensor con catalasa pura comercial .....   | 56 |
| 6.4. Biosensor combinado y miniaturizado .....   | 58 |
| 6.4.1. Primer prototipo miniaturizado .....  | 58 |
| 6.4.2. Segundo prototipo miniaturizado .....   | 62 |

|  |    |
|--|----|
| 6.4.3. Tercer prototipo miniaturizado..... | 64 |
| 7. Análisis de resultados .....            | 67 |
| 8. Conclusiones .....                      | 70 |
| 9. Bibliografía .....                      | 73 |



**Los resultados expuestos en este trabajo son originales y parte de ellos se presentaron en :**

**“ XV Biennial Conference on Chemical Education”,  
Universidad de Waterloo,  
Waterloo, Ontario, Canadá  
(9 al 13 de agosto, 1998)**

**“I Conferencia Internacional de Química”,  
Universidad Central de las Villas,  
Santa Clara, Cuba  
(5 al 8 de diciembre, 2000)**

PROGRAM BOOK

AUGUST 9-13, 1998

University of Waterloo

Waterloo, Ontario, Canada



15th BIENNIAL  
CONFERENCE on  
CHEMICAL  
EDUCATION

WATERLOO 98 / 133

**378 . Low Cost Construction Of Biosensors Selective To Urea And Hydrogen Peroxide In Electroanalytical Chemistry Laboratory .**

Edgar Jesus BORJA , Natalia CRUZ , Gloria GARCIA and Alejandro BAEZA, Facultad de Química , UNAM , Ciudad Universitaria, C.P. 4510 FAX 6 - 22 - 37 - 23 , MÉXICO , D.F ; [baeza@servidor.unam.mx](mailto:baeza@servidor.unam.mx)

The use of selective electrodes that incorporate a biomolecule as the selective inner element, is widely extended in analytical work. However their use is limited in education in the electroanalytical undergraduate laboratory because of the high cost of the biochemical component, usually a purified enzyme immobilized to a suitable transducer of the potentiometric signal. In this work we present the way to construct two low-cost biosensors: one built with crude potato tissue, obtained directly from a fresh potato, as biocomponent and a stainless steel wire as transducer; and the built with a crude extract from soybean flour as biocomponent and a thin oxide film over stainless steel as pH sensor. The potato biosensor presents a selective response to hydrogen peroxide and the soybean biosensor is selective to urea. Both present a potentiometric behavior according to Nikolski equation. Applications to real samples analyses are presented.

# UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS



OTORGA EL PRESENTE

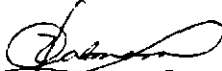
## CERTIFICADO

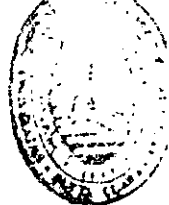
A: Natalia Cruz, Adrián de Santiago, Alejandro Baeza


POR LA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO: Design and characterization of enzymatic  
microelectrochemical cells to determine hydrogen peroxide

EN LA "1<sup>RA</sup> CONFERENCIA INTERNACIONAL DE QUÍMICA"

DADO EN LA FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA, SANTA CLARA, CUBA  
DEL 5 AL 8 DE DICIEMBRE DEL 2000.

  
DRA. NIDIA CABRERA BERMÚDEZ  
DECANA  
FAC. QUÍMICA Y FARMACIA

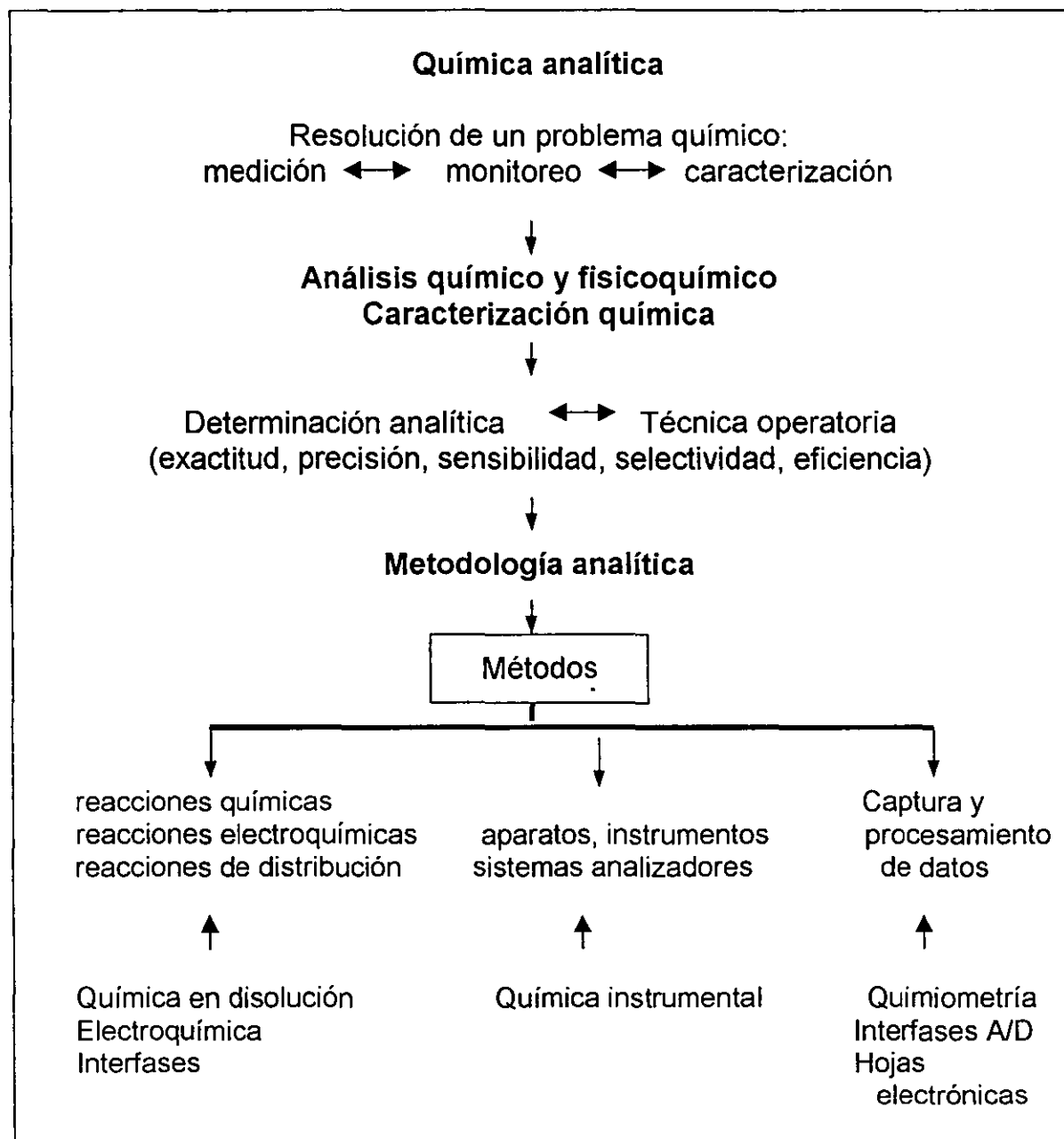


  
DRA. GRETIEL VILLANUEVA RAMOS  
PRESIDENTE  
COMITÉ ORGANIZADOR



## Prólogo

El trabajo analítico se ha convertido en una parte fundamental de la investigación básica y aplicada. Por tal motivo, se presenta a continuación la propuesta de organización estructurada para la química analítica que ha sido la base para este trabajo de tesis y que en los últimos años ha definido el doctor José Alejandro Baeza Reyes en el grupo de trabajo del laboratorio de Electroquímica Analítica de la División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química. UNAM:



Esquema Conceptual del trabajo analítico. (Dr. J.A. Baeza Reyes).

### Un Paso Más

*Hoy has dado un paso más,  
es una parte de todo  
lo que habrás de realizar*

Tu sabes que no estás sola  
con amigos contarás  
Te encontraste ya con unos  
con otros te encontrarás

¿Recuerdas el lago....?  
¿El círculo de amigos  
tomados de la mano,  
y la promesa que hicimos  
de regresar al hogar?

¿Recuerdas a nuestro Kobda?  
Aquellos ojos azules  
reflejaban su saber  
de la expresión de su amor deberemos  
aprender

Es necesario alistarse,  
aguzar bien los sentidos  
unos a lado de otros,  
siempre unidos.

Tenemos una misión  
y en otros planos nos vemos  
Trabajamos juntos, así crecemos  
y si hoy no recordamos, recordaremos.

El amor hermanará a las almas  
que debían estar unidas  
círculos de luz, armonía  
mil colores y una bella melodía

Pero aún no llega el día...  
Hoy has dado un paso más  
y el trabajo no termina  
queda mucho por andar

Recuerda aquella promesa...  
El azul del lago,  
los ojos del maestro  
y de todos los que en ese día  
aceptamos el gran reto

Ya sabrás que no es en vano  
que aquellos que son hermanos  
tienen que aceptar el reto  
de volver juntos y a tiempo

El trabajo sólo empieza  
queda mucho por andar  
cuentas con manos amigas  
que no debes olvidar

Mirando siempre al futuro  
y apostando a lo mejor  
empeñando para todo  
la vida y el corazón

Seguir el ejemplo siempre  
de aquél que sabe de amor  
para cosechar un día  
de los frutos el mejor

Sin haber vivido en vano  
y sin quedar a deber  
para ir a casa contentos  
y sin nada que temer

Que el camino que comienzas  
nos permita continuar  
la misión que un día aceptamos  
realizar juntos y más  
sin permitir que nos venzan  
el tedio o la adversidad.

Con dedicación especial a NRCM  
**Gloria G. R.**



## Abreviaturas

|                |       |   |
|----------------|-------|---|
| (p/p), (w/w)   | ..... | porcentaje peso en peso.  |
| ISE            | ..... | electrodo ión selectivo.  |
| ISE-enzimático | ..... | electrodo ión selectivo que contiene una o más enzimas.   |
| CHEMFET        | ..... | electrodo basado en transistor de efecto de campo.  |
| HRP            | ..... | enzima peroxidasa de rábano.  |
| Eref           | ..... | electrodo de referencia.  |
| Etrab          | ..... | electrodo de trabajo.   |
| Eaux           | ..... | electrodo auxiliar.   |
| ESC            | ..... | electrodo de referencia de calomel saturado.  |
| %error         | ..... | porcentaje de error.  |
| $[H_2O_2]$     | ..... | concentración molar de peróxido de hidrógeno.   |
| $[H_2O_2]_v$   | ..... | concentración molar de peróxido de hidrógeno obtenida mediante volumetría.  |
| $[H_2O_2]_b$   | ..... | concentración molar de peróxido de hidrógeno obtenida mediante el biosensor.  |
| E (mV)         | ..... | diferencia de potencial en milivolt.  |
| Elibre         | ..... | diferencia de potencial de una solución determinada en condiciones de equilibrio con respecto al electrodo de referencia. |
| I (A)          | ..... | corriente en ampere.  |



**“La Alquimia es la ciencia inmutable que trabaja sobre los cuerpos con ayuda de la teoría y de la experiencia, y que, por una conjunción natural, los transforma en una especie superior más preciosa”**

*Hermes Trismegisto.*

**“Es real, sin mentira, cierto y muy verdadero. Lo que está abajo es como lo que está arriba, y lo que está arriba es como lo que está abajo, para hacer el milagro de una sola cosa. Y así como todas las cosas han salido de una sola cosa por el pensamiento de uno, así mismo todas las cosas han nacido de esta cosa por adaptación.**

**Su padre es el Sol, su madre es la Luna, el viento lo ha llevado en su vientre; la tierra es su nodriza. Ahí está el padre de todo el Thelema del Universo. Su potencia sobre la Tierra no tiene límites.**

**Separarás la tierra del fuego, lo sutil de lo espeso, suavemente con gran industria. Él sube de la tierra al cielo, y en seguida vuelve a bajar sobre la tierra, y recoge la fuerza de las cosas superiores e inferiores.**

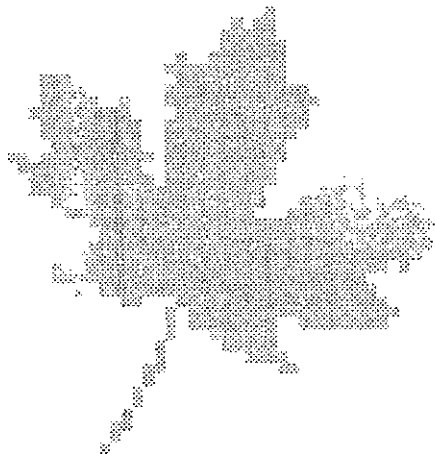
**Así tendrás toda la gloria del mundo, por eso toda oscuridad se alejará de ti.**

**Es la fuerza fuerte de toda fuerza, porque vencerá toda cosa sutil y penetrará toda cosa sólida. Así es como fue creado el mundo.**

**He aquí la fuente de admirables adaptaciones, aquí señalada. Por eso he sido llamado Hermes Trismegisto, que posee las tres partes fundamentales de la Filosofía Universal.**

**Lo que he dicho de la operación del sol, es completo.”**

*Tabla Esmeraldina.  
Hermes Trismegisto.*



## 3. Resumen

---

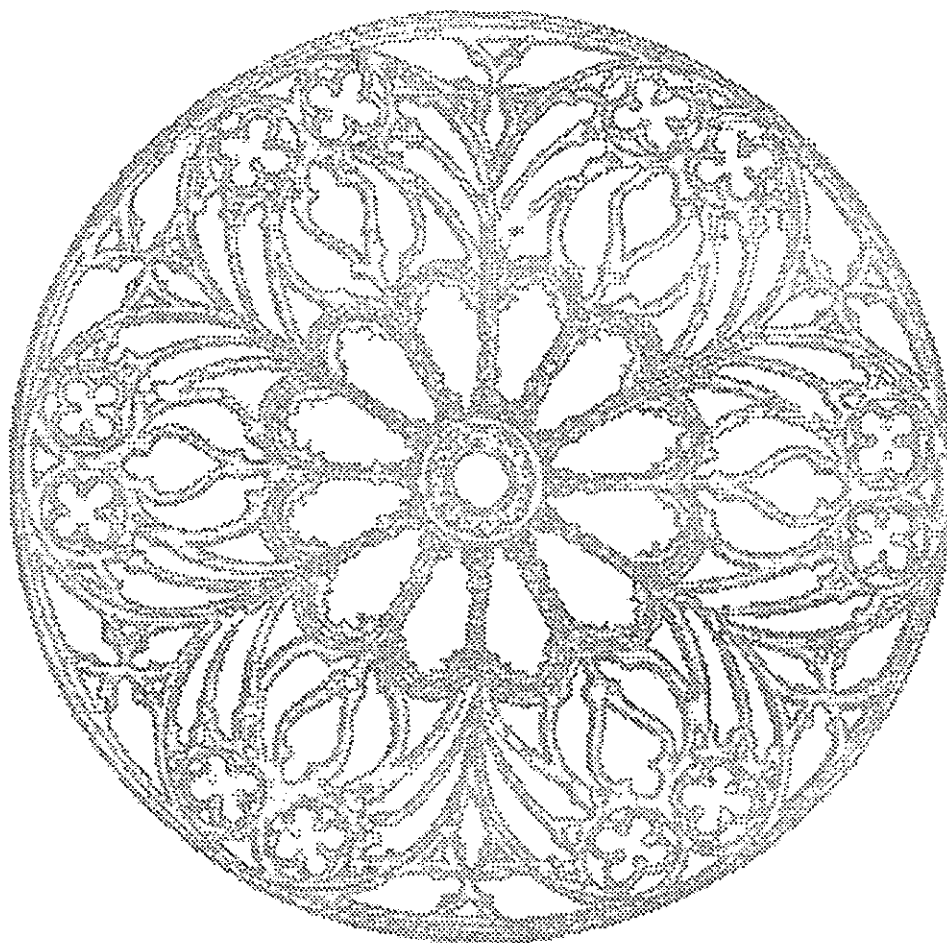
Los peróxidos, tienen una amplia aplicación en la industria, así como en el análisis químico, biológico y médico. Particularmente el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), se utiliza en soluciones al noventa por ciento (p/p), treinta por ciento (p/p) y tres por ciento (p/p) en la industria farmacéutica, de alimentos, textil, de plásticos, de cohetes y en desarrollo y control analítico.

Tradicionalmente la determinación del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) se ha realizado mediante valoraciones volumétricas. Dicha determinación analítica si bien es muy precisa, presenta inconvenientes, tal como el hecho de que los reactivos relacionados (soluciones de permanganato, tiosulfato, yoduro y almidón) sean inestables y deban ser preparados el mismo día de su uso, lo anterior convierte a la opción volumétrica en un proceso largo, cansado, muy contaminante, sobre todo poco selectivo y que requiere una gran cantidad de muestra para su análisis.

Por otra parte, en los últimos años el área electroquímica ha trabajado en desarrollar, mejorar e implementar nuevas microtécnicas, las cuales se caracterizan por una gran resolución. Concretamente los microelectrodos se han usados en análisis local dentro del rango micrométrico, lo cual ha permitido no solo iniciar, sino también localizar y monitorear procesos microscópicos. La miniaturización de una unidad de determinación para un analito, permite reducir la cantidad requerida de muestra y reactivos, logra la transformación directa de una cantidad química en una señal eléctrica y proporciona ciclos de determinación sencillos y de corta duración lo que finalmente hace posible un análisis permanente del sistema de interés.

Por lo anterior este trabajo propone la elaboración de un biosensor combinado miniaturizado selectivo a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) con catalasa pura como biocomponente selectivo y usando como transductor alambre de acero inoxidable. Se pretende que con éste

biosensor de muy bajo costo, sea posible trabajar eficazmente con la mínima cantidad de muestra y un mínimo procesamiento de la misma, lo que no solo posee un impacto ambiental significativo, ya que contribuye con la disminución de la generación de residuos contaminantes (ácido sulfúrico concentrado y permanganato), sino también implica una alternativa rápida y confiable con respecto a la volumetría para la cuantificación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en muestras farmacéuticas comerciales.



*Padrecito Sol*

Padrecito Sol, dame Vida, dame Luz, aquí en Tlalli

dame amor; refresca sana y purifica mi cuerpo

con el sonido del Teponaztli.

Límpiame con tus plumas de quetzal,

bañame con tus citlallis. Déja que el colibrí sagrado

anide en mi casa y en mi corazón.

Pon como guardián de mi familia al jaguar sagrado.

Sana mi mente y mi cuerpo con los cometas que humean,

deja que la Señora Xochiquetzal perfumé mi camino.

Retira el invierno de mi casa y deja que

la primavera sea eterna

y que mi jardín florezca, que halla Paz

y Alegría en mi familia.

Deja que el viento mueva mis ayoyotes

y me alerten en los peligros.

Deja que la luz de las luciérnagas

alumbren mi camino,

deja que pase la Luna Nueva,

déjame ver la Luna Llena,

déjame ver crecer el maíz sagrado,

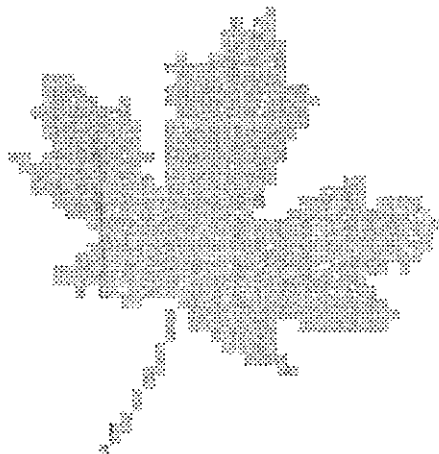
déjame ver que la tierra no muera,

déjame ver florecer,

déjame ser, déjame ser, déjame ser,

Padrecito Santo Sol, déjame ser.

*Tío Alejandro*



## Abstract

---

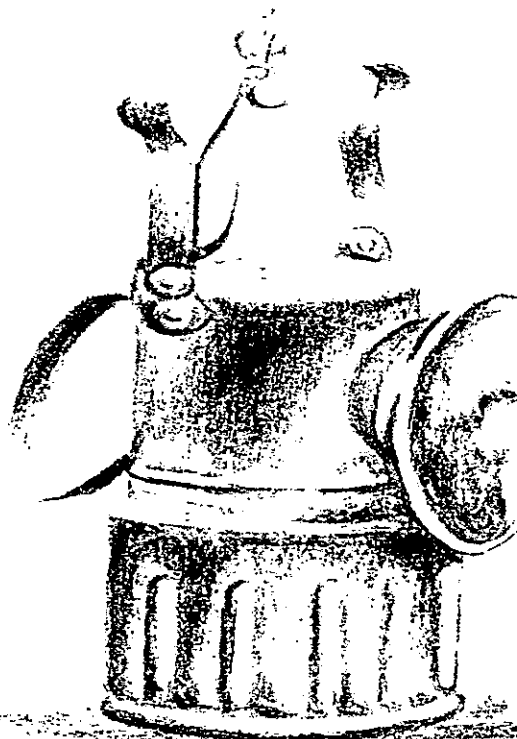
Peroxides have been used widely in the chemical industry, biological and physician analysis. Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) is used in concentration ninety, thirty and three per cent (w/w) in pharmaceutical, food, textile, plastic, and rocket industry and analytic determinations.

Traditionally hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) quantification has been made by means of titrimetric analysis. This analytical determination has several disadvantages, due to the instability of reagents employed (permanganate, thiosulfate, iodine and starch solutions) since they have to be used fresh. Thereby volumetric option is a long, hard and pollutive process. Volumetric analysis is a poor selective one, besides it requires big amounts of sample to be performed.

In other hand, in the last years electrochemical area studies have developed, improved and applied new microtechniques, with high resolution. Microelectrodes have been used for local analysis within the micrometer range, they permit not only to initiate but also to localize and monitor microscopic processes. Miniaturization of chemical analysis units allows to narrow down the required quantities of reagents and samples, to get the direct transformation of the chemical quantity into an electrical signal and to give short and easy cycles to determination and therefore to allow quasi continuous measurements for a particular system.

So this work proposes to built a low-cost compound miniaturized biosensor selective to hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), building with sheer catalase as biocomponent and a stainless steel wire as transductor, wich allows to perform an analysis with minimum volume and treatment of sample. So that it has a great environmental impact since it contibutes to reduce pollution by conc. sulfuric acid and permanganate solutions. Also it represents a quick and good alternative respect to volummetry for hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) quantification in commercial pharmaceutical samples.





**“Dice el filósofo: “Cambia las naturalezas y hallarás lo que buscas.” Esto es cierto, porque en nuestro Magisterio sacamos primeramente lo sutil de lo espeso, el espíritu del cuerpo y después lo seco de lo húmedo, es decir, la tierra del Agua, y así cambiamos las naturalezas; lo que estaba abajo, lo ponemos arriba, de suerte que el espíritu se convierte en cuerpo, y enseguida el cuerpo se transforma en espíritu...**

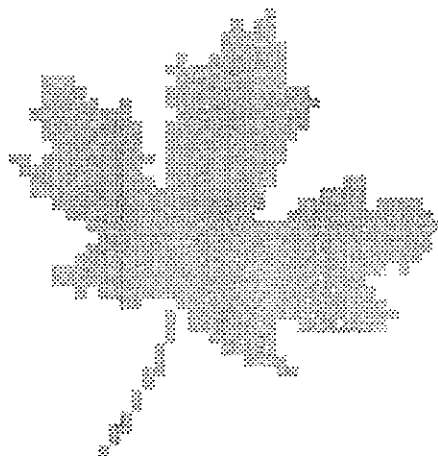
**...He aquí por qué el esperma no puede cambiar, permanece siendo tal cual era y no produce su efecto más que cuando es depositado en la matriz de la mujer. Por eso el Filósofo dijo: Si nuestra Piedra no es puesta en la matriz de la hembra, a fin de que sea nutrida, no crecerá ”.**

**¡Oh! Padre mío, héte aquí ya, según tu deseo, en posesión de la Piedra de los Filósofos.”**

*El Camino del Camino  
Arnaldo Villanueva.*

**“Hijo de la Ciencia, entonces tendrás la Cabeza del Cuervo que los Filósofos han buscado tanto, sin la cual no puede existir el Magisterio. .. Aprende ¡oh! Hijo mío, que nadie puede vivir si antes no ha muerto. Toma, por tanto, tu cuerpo negro, calcínalo en el mismo matraz durante tres días y después déjalo enfriar”**

*La Clavícula.  
Raymundo Lulio.*



# 1. Introducción

---

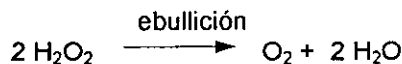
El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), hidroperóxido, dioxina o dioxyll es un líquido incoloro, muy inestable de sabor picante y cáustico para la piel. Es destilable al alto vacío. Puede descomponerse violentamente al contener trazas de impurezas. Es miscible en agua, soluble en éter, insoluble en éter de petróleo. Se descompone por la acción de disolventes orgánicos (1).

Se comercializa como una solución acuosa en concentraciones al noventa, treinta y tres por ciento en peso, las cuales se deterioran gradualmente y se estabilizan por lo general por la adición de acetanilida o sustancias orgánicas similares. La agitación o contacto con superficies rugosas, metales o mucha otras sustancias (tales como álcalis), aceleran su descomposición. La presencia de ácidos minerales le proporcionan una mayor estabilidad (1).

En soluciones al noventa por ciento se utiliza en la propulsión de cohetes; como agente acondicionador madurador y blanqueador de alimentos; antiséptico tópico y agente blanqueador de superficies (1)

Para diversas determinaciones analíticas, es necesario llevar el estado de oxidación del analito a un valor que permita efectuar la titulación como un agente oxidante o reductor (2).

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es un buen oxidante en soluciones básicas. Puede transformar  $Co(II)$  en  $Co(III)$ ,  $Fe(II)$  en  $Fe(III)$  y  $Mn(II)$  en  $Mn(IV)$ . Es un reductor de fuerza media, en soluciones ácidas, puede reducir  $Cr_2O_7^{2-}$  o  $Cr^{3+}$  y  $MnO_4^{2-}$  a  $Mn^{2+}$ . En agua hirviente, el exceso de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) dismuta cuantitativamente de manera espontánea.



Se utiliza también como agente desenmascarante, en la liberación de  $\text{Cu}^{2+}$  del complejo  $\text{Cu}(\text{I})$ -tiourea (2) y en la adsorción de disulfuro de hidrógeno gaseoso en disolución amoniacal para evitar su interferencia en la determinación de disulfatos.

Dado que es un oxidante muy fuerte, sin diluir puede causar severas quemaduras a la piel y membranas mucosas. Debe evitarse su contacto con todo tipo de material combustible (ya que puede correrse el riesgo de producir fuego) y su contaminación siendo que esto origina su propia descomposición produciendo un incremento en la presión del contenedor debido a la generación del gas oxígeno (1).

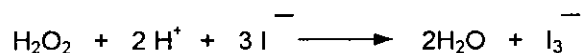
Las soluciones al treinta por ciento o superoxol, poseen treinta por ciento en peso de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), lo equivalente a cien volúmenes de oxígeno. Es un líquido transparente con densidad aproximada de 1.11. Es miscible en agua, no reemplaza en uso industrial a las soluciones al tres por ciento, para ello se necesita su previa dilución. Se usa principalmente para elaborar precisamente soluciones al tres por ciento (1).

Las soluciones de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) al tres por ciento, también conocidas como oxydol, contienen de dos punto cinco a tres punto cinco por ciento en peso de éste reactivo (de ocho a doce volúmenes de oxígeno). Su apariencia es la de un líquido incoloro; débilmente ácido, con densidad cercana a 1; debe protegerse de la luz y mantenerse en lugar frío. Es compatible con álcalis, amonio y sus carbonatos, albúmina, bálsamo de Perú, fenol, carbón, cloruros, citratos alcalinos, sales ferrosas, mercurosas o áuricas, hipofosfitos, ioduros, permanganatos, sulfitos, tinturas y material orgánico en general (1).

Se utiliza en la industria de los plásticos; como blanqueador de plumas, cabello, seda, paja, marfil, harinas, huesos, gelatina y textiles. En la restauración de grabados y pinturas antiguas; como oxidante en la manufactura de tinturas; desinfectante de agua; en el refinado de aceites y grasas con parafenilendiamina como tinte para pieles, cabello, etc.; en el añejamiento artificial de los vinos, licores, etc. En preparaciones farmacéuticas tales como enjuagues bucales, dentríficos, lociones sanitarias. Se usa también como antiséptico tópico (1).

La determinación de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) tradicionalmente se realiza por medio de valoración volumétrica. De ésta forma, para conocer la concentración de una muestra, ésta debe valorarse mediante una solución de permanganato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ , usada como patrón secundario), la cual ha de titularse previamente con una solución de oxalato de sodio ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ , patrón primario). Dicha valoración se efectúa en medio ácido con formación de  $\text{Mn}(\text{II})$  como producto de la reacción. El punto final se monitorea mediante el color rosado del permanganato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ ) cuando la reacción ha concluido y existe un exceso del mismo (3-6).

En la cuantificación yodométrica, el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oxida cuantitativamente al ión yoduro (patrón secundario):



el ión resultante, triyoduro, es valorado después en medio ácido con una solución de tiosulfato (patrón primario), usando almidón al uno por ciento en solución acuosa como indicador del punto final (desaparición progresiva de un intenso color azul) y molibdato de amonio  $[(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4]$  como catalizador (2-5).

Las determinaciones anteriores implican muchos pasos y la inversión de al menos un día de trabajo. El inconveniente de que los reactivos relacionados (soluciones de permanganato, tiosulfato, yoduro y almidón) sean inestables, sugiere que éstos deben ser preparados el mismo

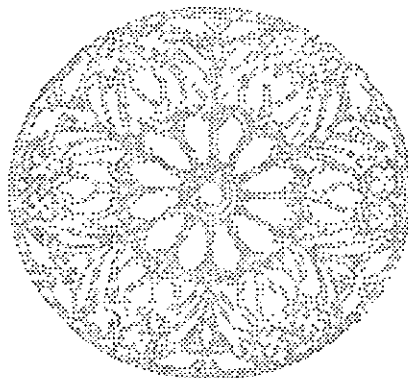
día de su utilización (3,4 y 5). Lo anterior convierte al método volumétrico en una opción larga, cansada y muy contaminante; poco selectiva y aunque representa una determinación precisa, es poco sensible.

Refiriéndome ahora a la utilización de electrodos biológicos (dispositivos que incorporan una(s) biomolécula(s) como elemento selectivo interno), ésta se encuentra ampliamente extendida en la química analítica. La detección y valoración de analitos diversos mediante dichos electrodos presenta múltiples ventajas, tales como: alta especificidad, medición rápida, simplicidad, mínima cantidad de reactivos, determinaciones independientes al color de la muestra, uso del elemento biológico en forma repetida y la posibilidad de la automatización (7-9). Aunque es una determinación de menor precisión, es muy sensible.

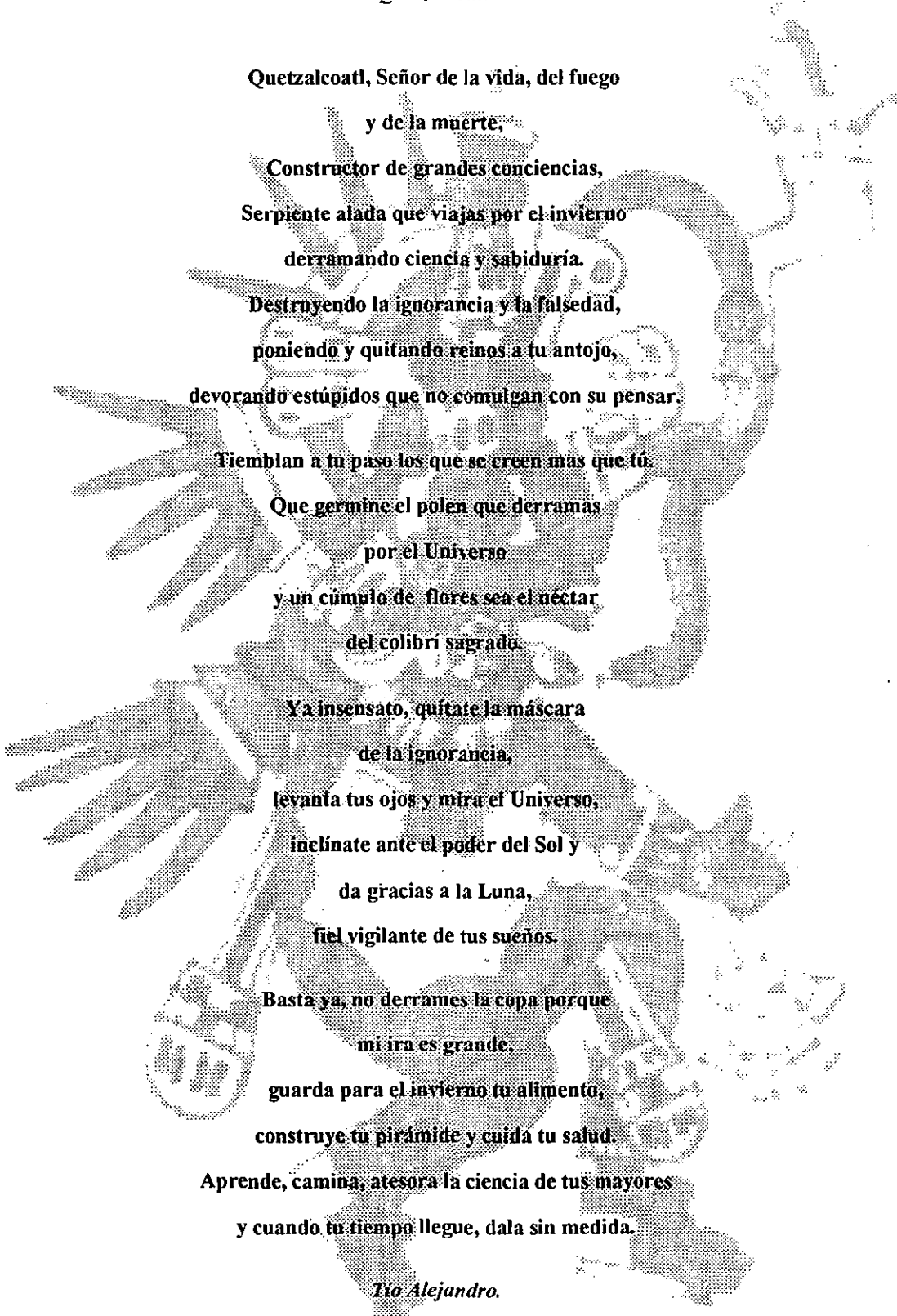
El uso de los biosensores en la docencia, particularmente en nuestro caso, en laboratorios de formación a nivel licenciatura, posee limitantes debido al alto costo que implican los componentes biológicos y el transductor adecuado (que hace posible recoger la señal potenciométrica) que los integran.

En el presente trabajo de tesis se pretende el desarrollo de un electrodo miniaturizado, económico, de fácil montaje para la cuantificación selectiva de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que en su construcción se utilice catalasa como el biocomponente selectivo al analito de interés y alambre de acero inoxidable como transductor; cuyo uso sea factible en los laboratorios que se imparten en la Facultad de Química (en Ciudad Universitaria) en las asignaturas: Química Analítica Instrumental I (clave 1556) correspondiente al cuarto semestre de la carrera de Químico-Farmacéutico-Biólogo y al quinto semestre de las carreras de Química y Química de Alimentos de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Así pues, la determinación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) de una muestra comercial utilizando dicho biosensor, puede sugerirse como una práctica de laboratorio provechosa en la formación académica de los futuros profesionistas, acorde al plan de estudios de dichas carreras. Además el microsistema servirá de prototipo para el desarrollo de microcámaras electroanalíticas para trabajos en investigación formal básica y aplicada.

Finalmente un biosensor de este tipo posee un impacto ambiental significativo pues contribuye a la disminución de residuos contaminantes (ácido sulfúrico concentrado y permanganato) y una alternativa rápida y confiable con respecto al método volumétrico para la valoración de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) de muestras farmacéuticas comerciales.

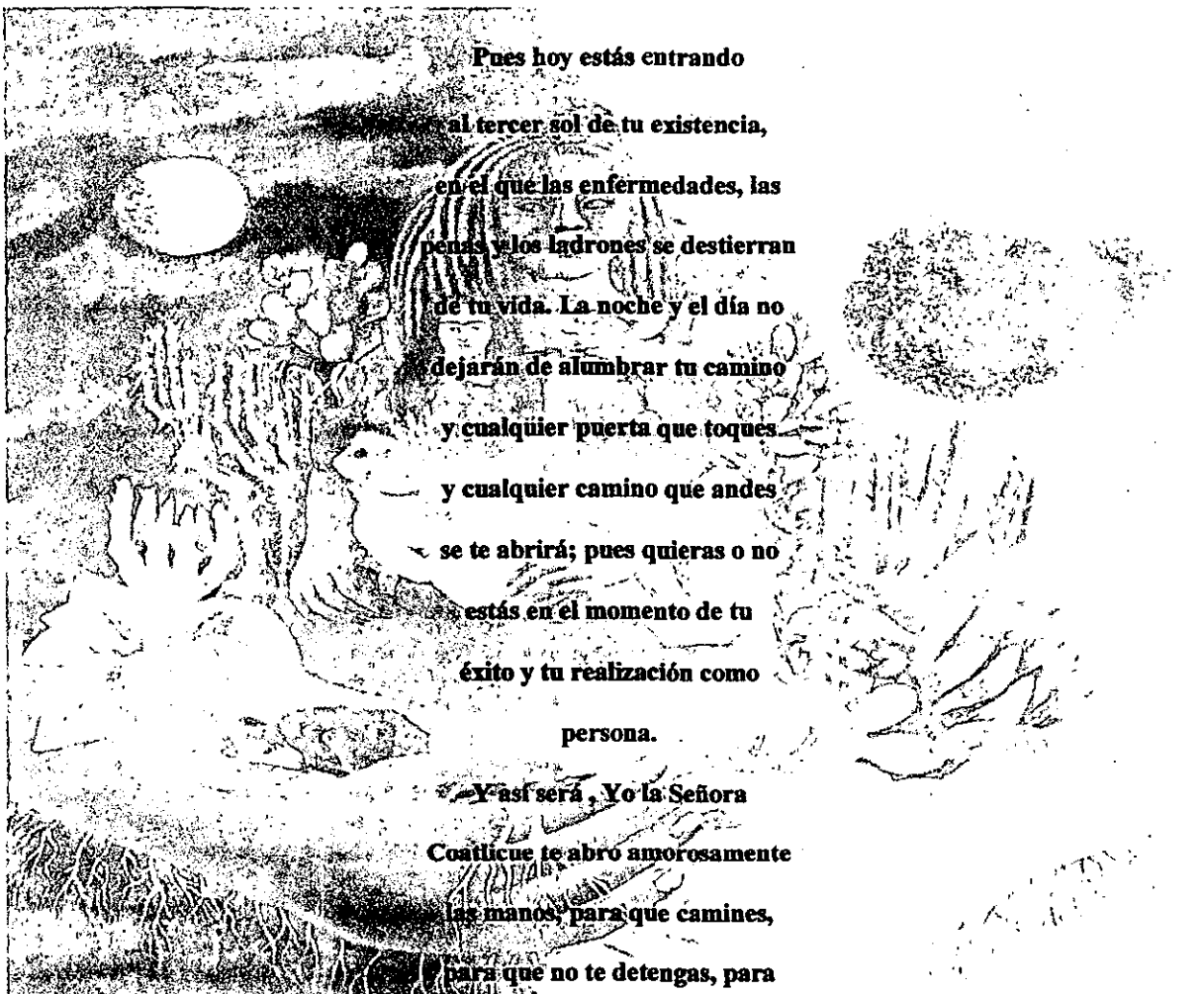


*Quetzalcoatl*



Quetzalcoatl, Señor de la vida, del fuego  
y de la muerte,  
Constructor de grandes conciencias,  
Serpiente alada que viajas por el invierno  
derramando ciencia y sabiduría.  
Destruyendo la ignorancia y la falsedad,  
poniendo y quitando reinos a tu antojo,  
devorando estúpidos que no comulgan con su pensar.  
Tiemblan a tu paso los que se creen más que tú.  
Que germine el polen que derramas  
por el Universo  
y un cúmulo de flores sea el néctar  
del colibri sagrado.  
Ya insensato, quítate la máscara  
de la ignorancia,  
levanta tus ojos y mira el Universo,  
inclínate ante el poder del Sol y  
da gracias a la Luna,  
fiel vigilante de tus sueños.  
Basta ya, no derrames la copa porque  
mi ira es grande,  
guarda para el invierno tu alimento,  
construye tu pirámide y cuida tu salud.  
Aprende, camina, atesora la ciencia de tus mayores  
y cuando tu tiempo llegue, dála sin medida.

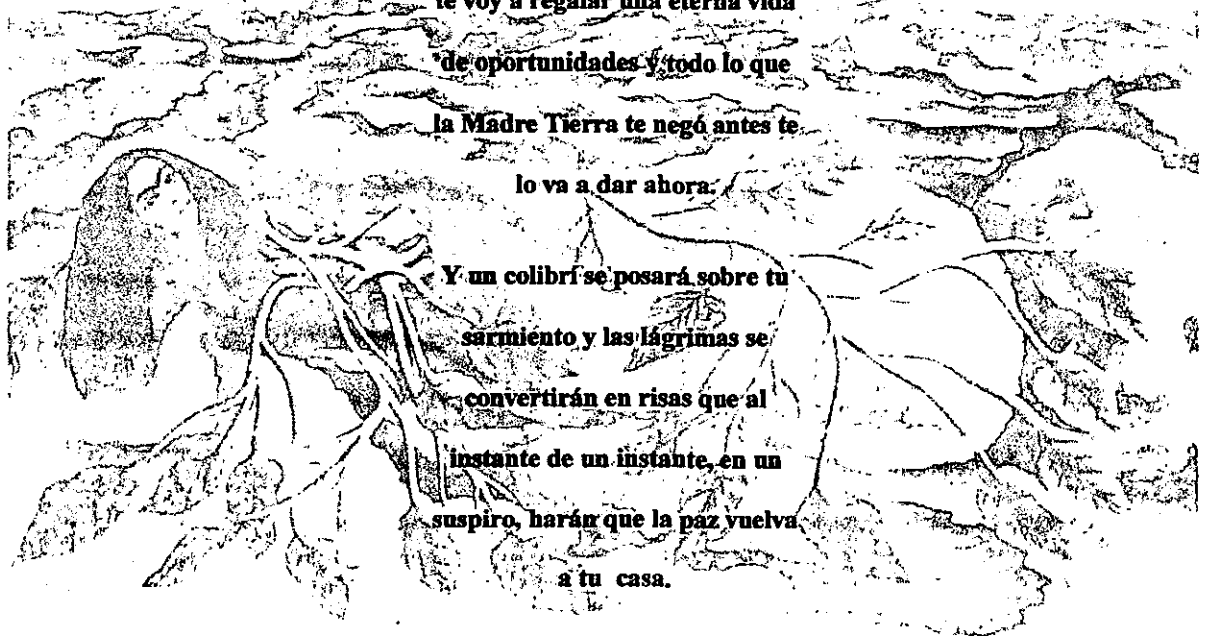
*Tío Alejandro.*



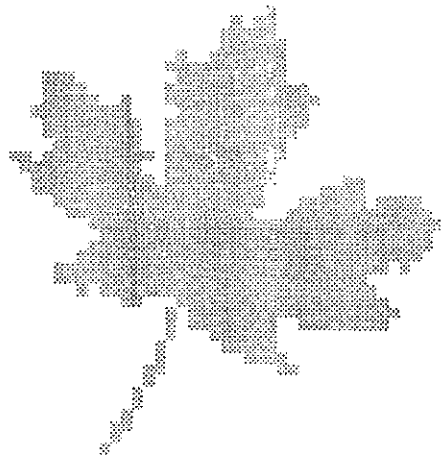
Pues hoy estás entrando  
al tercer sol de tu existencia,  
en el que las enfermedades, las  
penas y los ladrones se destierran  
de tu vida. La noche y el día no  
dejarán de alumbrar tu camino  
y cualquier puerta que toques  
y cualquier camino que andes  
se te abrirá; pues quieras o no  
estás en el momento de tu  
éxito y tu realización como  
persona.

Y así será, Yo la Señora  
Coatlícue te abro amorosamente  
las manos, para que camines,  
para que no te detengas, para

que no cometas errores, pues yo  
te voy a regalar una eterna vida  
de oportunidades y todo lo que  
la Madre Tierra te negó antes te  
lo va a dar ahora.



Y un colibrí se posará sobre tu  
sarmiento y las lágrimas se  
convertirán en risas que al  
instante de un instante, en un  
suspiro, harán que la paz vuelva  
a tu casa.



## 2. Antecedentes

---

### 2.1. Breve reseña de biosensores.

La necesidad de cuantificar el grado de acidez, fue desde hace mucho, indispensable en los campos de la química, la fisiología y en procesos industriales tales como la fermentación láctica. Fue Nernst el primero en cuantificar la acidez de una solución mediante un electrodo de vidrio utilizando la técnica potenciométrica (en la cual se determina el potencial formado en la interfase de una solución y la superficie de un electrodo, de este modo se conoce la cantidad o actividad de un analito en solución); (10,11,12).

No obstante, el electrodo de hidrógeno es totalmente impráctico para estimar la acidez en otros medios distintos al acuoso, así se construyeron posteriormente el electrodo para quinidrona y el electrodo para antimonio en 1906 (cuyo principio se basa en el electrodo de vidrio). De esta manera se inició la tecnología de los electrodos selectivos, que integran conceptos de química en solución, electroquímica (el electrodo) y la electrónica. Actualmente se reconoce que la era de los Electrodo Ion Selectivos o ISEs, se inició con el trabajo teórico de Eisenman-Nikolski, cuya ecuación expresa la teoría y el concepto de selectividad de los mismos (1957-1962); (10,12).

Más adelante la necesidad de cuantificar la actividad de sodio y potasio en fluidos para el propósito de estudios fisiológicos, llevó primero al desarrollo de un electrodo para sodio. Lo cual abrió un amplio campo en la caracterización de nuevos materiales para la determinación selectiva de especies iónicas. Así se citan a Tandeloso y Kolthoff en la fabricación de electrodos selectivos a iones haluros ;(10).

A partir de la década de los treinta, se usaron alambres de plata recubiertos por cloruro,

## Antecedentes

### Breve reseña de biosensores.

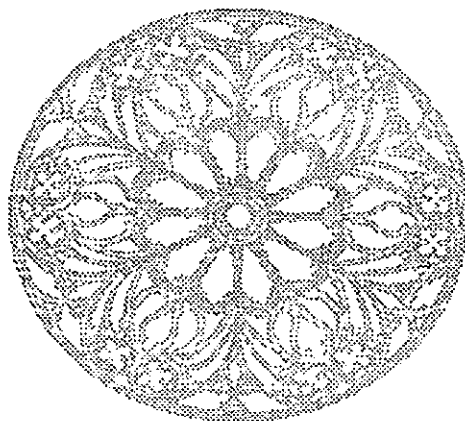
---

bromuro, yoduro o disulfuro de plata como electrodos indicadores y de referencia. De ésta forma fueron posibles titulaciones potenciométricas y la determinación directa del potencial para estimar productos de solubilidad durante los sesentas; (10).

También en la década de los sesentas, Ross introduce el nuevo concepto de membranas líquidas al construir un electrodo de calcio y Frant elabora un electrodo para fluoruros. Después de estos sensores, aparecieron una gran cantidad de electrodos para gases. El campo de la química sanguínea, específicamente la determinación de electrolitos (K,Na,Ca,O<sub>2</sub>,CO<sub>2</sub> y Mg) y gases sanguíneos tuvo un gran desarrollo debido a éstos avances (13).

En los años setentas, numerosos artículos y monografías son publicados y se llevan a cabo congresos internacionales que ilustran las aplicaciones de los ISEs. Se llevan a cabo dos innovaciones importantes: primera, la introducción de PVC (polímero de cloruro de polivinilo) como un material que favorece la simplificación de ISEs y la introducción de sólidos redox en los sistemas de referencia; y segundo, la posibilidad de utilizar materiales electroactivos, tales como polipéptidos y un nuevo grupo de ligandos conocidos como acarreadores neutros. Stefanec en 1966-1967, se enfocó en sustancias naturales tales como la nonactina, las cuales facilitan el transporte de metales alcalinos a través de membranas lipídicas. Este trabajo llevó a la construcción del electrodo de valinomicina para ión potasio, con sorprendente selectividad (el cual es ampliamente usado en la actualidad en los analizadores comerciales); (13). Otro compuesto, el ETH1001, fue descubierto en 1975 y fue la base de un ISE a calcio, de alta selectividad (también muy empleado en los analizadores clínicos comerciales). Se desarrollaron más tarde sistemas capaces de usarse en medios no acuosos cuya principal función ha sido optimizar las condiciones de reacción de muchas síntesis orgánicas (10,14).

Finalmente, en 1977 Gilbault inventó un ISE-enzimático, el cual fue inspirado en los nuevos sensores electroquímicos, de los cuales se tiene como primera mención, al elaborado por Clark en 1970, quien fusionó un dispositivo amperométrico a un sensor de glucosa (integrando en tal sensor el enzima glucosa oxidasa). Tales dispositivos fueron denominados biosensores ya que integran un biocomponente como elemento selectivo. El grado de refinamiento actual de los biosensores ha hecho posible, determinaciones rápidas, confiables y simples, no solo de sustancias orgánicas sino también inorgánicas con una sensibilidad, en general, de hasta 10<sup>-5</sup> M (lo cual no es posible con la mayoría de los sensores electroquímicos convencionales) y su uso se ha extendido de tal manera, que han venido reemplazando los ensayos y clínicos e industriales tradicionales y se han integrado en equipos automatizados que permiten un control y estudio más detallado de ciertos procesos (6,10,13).





## 2.2. Clasificación de los biosensores.

Un biosensor es un dispositivo que incorpora una sustancia bioactiva (enzimas o sistemas multienzimáticos, componentes membranales, citocromos, hormonas, anticuerpos, microorganismos, etc.) que reconoce específicamente a una especie de interés (analito), puesta en íntimo contacto con el sistema para reconocer a una sustancia específica –generalmente una especie iónica- y que es capaz de transformar esta respuesta química a una señal eléctrica; por ejemplo, un ISE). Debido a que los materiales biológicamente sensitivos son los responsables de reconocer al analito, también regulan la especificidad y sensibilidad del sensor (15).

Los biosensores pueden clasificarse de acuerdo al tipo de transductor empleado en su elaboración de la siguiente manera; (16):

| Tecnología de transductor empleado. | Señal de salida     |
|-------------------------------------|---------------------|
| Electroquímica                      |                     |
| Amperométrica                       | Corriente aplicada  |
| Potenciométrica                     | Voltaje             |
| Conductimétrica                     | Impedancia          |
| Óptica                              |                     |
| Colorimétrica                       | Color               |
| Luminiscencia                       | Intensidad luminosa |
| Fluorescencia                       | Intensidad luminosa |
| Calorimétrica                       |                     |
| Termosensor                         | Temperatura         |

Las características de los biosensores mencionados se describen brevemente a continuación:

**2.2.a.1. Potenciométricos.** Los bioelectrodos enzimáticos convencionales consisten en electrodos ión-selectivo (ISE) que se encuentran cubiertos por una o más enzimas inmovilizadas. La reacción enzimática con el analito genera un cambio en el potencial, resultado de la acumulación o liberación de un ión en particular. Los transductores potenciométricos miden la diferencia de potencial que se genera en la membrana selectiva al ión que separa dos soluciones a un flujo de corriente cero. Debido a la relación logarítmica entre el potencial generado y la concentración del analito, es posible un amplio intervalo de detección. Este tipo de biosensores requiere electrodos de referencia estables(17).

**2.2.a.2. Amperométricos.** Los biosensores enzimáticos amperométricos constituyen los dispositivos con mayor disponibilidad en el mercado actual. En contraste con los sensores potenciométricos, los sensores amperométricos operan a un potencial impuesto con respecto al electrodo de referencia y la corriente generada por la oxidación o reducción de especies sobre la superficie del electrodo de trabajo es determinada. La mayoría de los bioelectrodos amperométricos se basan en el uso de enzimas redox, por lo que su éxito se basa en la gran disponibilidad de enzimas óxido-reductasas, capaces de actuar sobre ácidos grasos, azúcares, aminoácidos, aldehídos y fenoles(18).

**2.2.a.3. Conductimétricos.** Muchas reacciones catalizadas por enzimas involucran cambios en las especies iónicas y por tanto en la conductividad de la solución en la cual la reacción se lleva a cabo, sin embargo, tal determinación no es específica. En los casos en que la especificidad no juega un papel importante, la conductividad proporciona extrema sensibilidad.

**2.2.a.4. Térmicos.** Los biosensores enzimáticos térmicos se basan en el calor involucrado en una reacción enzimática, que es capaz de determinarse calorimétricamente y correlacionarse con la cantidad de sustrato presente. Las enzimas se unen directamente al transductor de temperatura. Es posible detectar cambios de temperatura hasta en diez a la menos cuatro grados centígrados (19). Las principales desventajas en éstos sistemas son las aportaciones térmicas inespecíficas, entre las que se encuentran el calentamiento de la misma unidad biosensora (esto se ha eliminado mediante el control termostático de la unidad, sin embargo, tal requerimiento adicional, incrementa el promedio del costo del sistema).

**2.2.a.5. Ópticos.** Estos biosensores monitorean la interacción de un biocatalizador y el analito diana basados en propiedades ópticas, tales como la absorción de luz ultravioleta visible, bio- y quimioluminiscencia, reflectancia y fluorescencia. La oxidación y reducción del NAD(P)H durante las reacciones enzimáticas características de las dehidrogenasas pueden seguirse determinando la fluorescencia del NAD(P)H (cuya excitación se determina a 450nm), relacionándose los cambios en la intensidad de la fluorescencia con la concentración de sustrato. En otros casos el cofactor NAD(P)H tiene seguimiento debido a su interacción con otro colorante fluorescente o bien, son usados colorantes cuya fluorescencia es dependiente del pH, tales como el isotiocianato de fluoresceína (FITC), (20,21). En el caso de la luminiscencia, se han empleado combinaciones de enzimas bacterianas luminiscentes en presencia de NADH y enzimas dehidrogenasas dependientes de NAD(P)H en sistemas biosensores en los cuales el analito de interés reacciona con el enzima dehidrogenasa en presencia de NAD(P) produciendo finalmente NAD(P)H, que es detectado por el enzima bacteriana al producirse la luminiscencia esperada; (22). La quimioluminiscencia en biosensores ópticos tiene su base en la reacción que se lleva a cabo entre el luminol y el peróxido de hidrógeno como producto de la acción catalizada por una enzima oxidasa; (23). Finalmente, los cambios en la absorbancia determinados en un biosensor y que más tarde pueden relacionarse con la cantidad de analito, son consecuencia de la formación de un producto cromóforo por el enzima inmovilizada sobre el electrodo; (24). Los biosensores ópticos poseen amplias ventajas prácticas, encontrando su único inconveniente en la inestabilidad de las sustancias ópticamente activas empleadas en los dispositivos.

En cuanto a la construcción de biosensores que integran enzimas puede hablarse de una clasificación basada en la estrategia principal que siguen los dispositivos conocidos para la determinación de múltiples analitos diana; (25, 26):

*Biosensores enzimáticos convencionales.*

*Biosensores que integran mediadores electrónicos.*

*Bioelectrodos basados en competición enzimática.*

*Inmunobiosensores que utilizan lisis de células o liposomas mediada vía complemento.*

*Biosensores basados en bioafinidad.*

*Biosensores basados en células o tejidos completos.*

**2.2.b.1. Biosensores enzimáticos convencionales.** Se emplea el uso de una o más membranas (generalmente composites multicapa que contienen una o más enzimas inmovilizadas, lo que implica su reutilización y la disminución en el costo del biosensor) cuya naturaleza física o química, permite la eliminación de interferencias, de ésta manera se aísla al analito de interés para ser transformado posteriormente en especies iónicas detectables potenciométrica o amperométricamente (ISEs); (6,15).

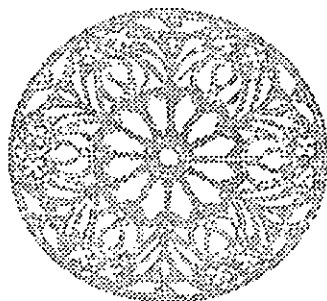
**2.2.b.2 Biosensores que integran mediadores electrónicos.** Tales dispositivos son biosensores enzimáticos convencionales en el que el cofactor enzimático es reemplazado por un mediador químico que al ser reciclado en el electrodo a través de su oxidación o reducción proporciona la señal de transducción del sistema. Las sustancias consideradas mediadores electroactivos y que se usan en la modificación de pequeñas moléculas incluso proteínas son: ferroceno y sus derivados, etosulfato de fenazina, benzoquinona, hexacianoferrato, sales conductoras –moléculas orgánicas planares con susceptibilidad a la deslocalización de orbitales  $\pi$  - tales como sales de tetratianofulvalinio (TTF), N-metilfenazinio(NMP<sup>+</sup>), trietilamonio (TEA), tetracianoquinodimetanida (TCNQ), 9-dicianometileno-2,4,7-trinitrofluoreno (DTF); (15, 25).

**2.2.b.3. Bioelectrodos basados en competición enzimática.** En éste caso dos enzimas (una de ellas dependiente de NAD(P) y otra dependiente de oxígeno) son inmovilizadas sobre un electrodo sensible a oxígeno y a NAD(P)H. Ambas enzimas al estar en contacto con la muestra, compiten por el sustrato correspondiente cuya concentración es determinada mediante la determinación simultánea sobre el electrodo de trabajo de oxígeno y NAD(P)H; (15,20,21).

**2.2.b.4. Inmunosensores que utilizan lisis de células o liposomas mediada vía complemento.** Estos sensores presentan una sensibilidad muy alta mediante un efecto amplificador en el cual intervienen células o liposomas que al ser lisados liberan marcadores dentro de la muestra que entonces son detectados en el electrodo; (25).

**2.2.b.5. Biosensores basados en bioafinidad.** Este concepto es semejante a los biosensores basados en competición enzimática. En estos dispositivos se utilizan dos sustancias conjugadas: A y B a catalasa. En tales condiciones, el enzima catalasa es incapaz de reaccionar con su sustrato, peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Al entrar en contacto el sistema con el analito (el cual presenta una afinidad mayor por la sustancia B), éste desplaza a la sustancia A del conjugado permitiendo la acción enzimática (se requiere por tanto la presencia del sustrato en el medio). De este modo la cantidad de oxígeno producida por la catalasa es determinada y así indirectamente la cantidad del analito. En éste tipo de ensayo es posible la posterior regeneración del electrodo y el monitoreo de hormonas y pequeñas moléculas; (25).

**2.2.b.6. Biosensores basados en microorganismos, células o tejidos completos.** Son precisamente aquellos dispositivos que integran microorganismos tales como bacterias, células o tejidos completos (animales o vegetales). Dichos biocomponentes se fijan generalmente al transductor mediante una membrana de diálisis o micropore. Su principio de operación es semejante al biosensor enzimático convencional, con la diferencia de que pueden regenerarse si se guardan en un medio de cultivo adecuado (lo que aumenta su tiempo de vida); pesar de ésta ventaja pueden presentar poca selectividad y requieren de un tiempo prolongado (tres a cuatro horas) en recobrar sus condiciones originales entre una y otra determinación (6,15,27).



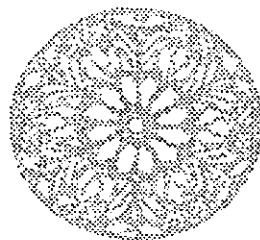
### 2.3. La miniaturización en biosensores .

En respuesta a la necesidad de determinaciones en continuo, el diseño de nuevos dispositivos biosensores en los últimos años ha contemplado la ventaja de la miniaturización. Los bioelectrodos resultantes presentan las mismas características que los electrodos convencionales y en ocasiones los superan presentando mayor sencillez, durabilidad, tamaño compacto, menor cantidad de materiales, reactivos y muestra requeridos, por tanto, un bajo costo; (15). Todo lo cual hace atractivo su uso en la investigación básica y aplicada, especialmente para aplicaciones in vivo;(16).

La miniaturización de los biosensores se inició en los setenta, cuando James B. Angell y Kensall D. Wise construyeron electrodos miniatura sobre chips de silicón, capaces de realizar determinaciones electroquímicas en tejido neuronal. A su vez, Jiri Janata cubrió la superficie de un transistor de efecto de campo con anticuerpos específicos para concanavalina A, introduciendo de éste modo el concepto de los sensores CHEMFETs. Estudios posteriores de éstos dispositivos han llevado a técnicas generales que combinan componentes químicos y circuitos integrados en sistemas únicos; así en la década los ochentas, se construyó el primer sensor para glucosa de Clark miniaturizado;(27).

Una innovación en la comunicación y en la industria de semiconductores con gran impacto en la miniaturización de bioelectrodos fue la aparición de las fibras ópticas, las cuales fueron combinadas con fuentes de luz (tales como láseres de estado sólido) y filtros monocromáticos, dando lugar a espectrofotómetros miniaturizados. El primer biosensor de éste tipo fue construido por Gerald G. Vurek y Robert Bowman en 1969, para aplicación clínica. Actualmente pueden distinguirse tres categorías de mini-biosensores que siguen éstos principios, a saber: (a) aquellos dispositivos capaces de detectar cambios en las propiedades ópticas de las sustancias diana, que siguen la línea de las técnicas de los biosensores electrónicos convencionales, (b) los biosensores conocidos como de "onda evanescente" y (c) dispositivos con superficie de plasmon; (27).

Hoy en día las dimensiones con las que un biosensor de este tipo cuenta, son del orden de unos cuantos milímetros o incluso micras. La estandarización de métodos de manufactura ha permitido la producción en serie de sensores idénticos a un costo por unidad muy bajo; (10). De ésta forma es factible que un sensor destinado a determinaciones médicas sea desechado después de su utilización, evitando el riesgo de contaminación a posteriores pacientes debido a su uso repetido; también es posible la adaptación de éstos dispositivos a catéteres, con los cuales el monitoreo de la química sanguínea se realiza en continuo (un ejemplo práctico, es un biosensor en pacientes diabéticos, este dispositivo diseñado por P. F. Turner combina un sensor integrado a un circuito amplificador y a una pantalla pequeña de cristal líquido, todo esto colocado en un recipiente cuyo tamaño es el de una pluma fuente), tal como sucede con instrumentos convencionales que estudian las condiciones de la función cerebral, la presión sanguínea o la frecuencia cardiaca; (16,27).



**2.4. Importancia de la determinación del peróxido de hidrógeno ( H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ) como analito y en sistemas biosensores electroquímicos.**

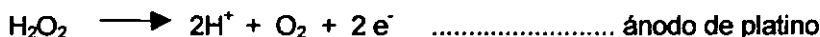
No obstante, la importancia de la cuantificación de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en la industria farmacéutica, de alimentos, de textiles, de cohetes, etc., como ya se describió antes; en el campo de los biosensores enzimáticos la determinación de nuestro analito cobra particular interés, tal como se explica a continuación.

Los primeros biosensores utilizaron la detección de la cantidad o actividad de H<sup>+</sup> y de O<sub>2</sub> como método de señal de transducción. La construcción se basó también en la utilización de enzimas oxidasas, siendo la más frecuente la glucosa oxidasa (para la determinación de glucosa), cuya reacción catalizada es la siguiente; (28):



En la secuencia de reacción vista arriba, se observa el consumo de oxígeno y el incremento de los productos peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y ácido glucónico. La determinación de ácido glucónico y oxígeno como señal de transducción en éste caso presenta diversas interferencias debidas al medio en el cual se realiza la cuantificación. El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), sin embargo puede cuantificarse a través de su reducción sobre el electrodo de trabajo, lo cual lo ha convertido en el método más empleado como señal de transducción en biosensores enzimáticos (en la actualidad un poco más del 65% de los biosensores enzimático a usan éste método); (29).

El método de construcción clásico de los sensores para peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) involucra un ánodo de platino y un cátodo Ag<sup>0</sup>/AgCl (28):



La posibilidad de detección de una gran variedad de diversos analitos a través de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se ha llevado a cabo dada la amplia disponibilidad que tienen las enzimas oxidasas capaces de producir dicho analito en su actividad catalítica (las cuales son inmovilizadas sobre la superficie del electrodo de trabajo):

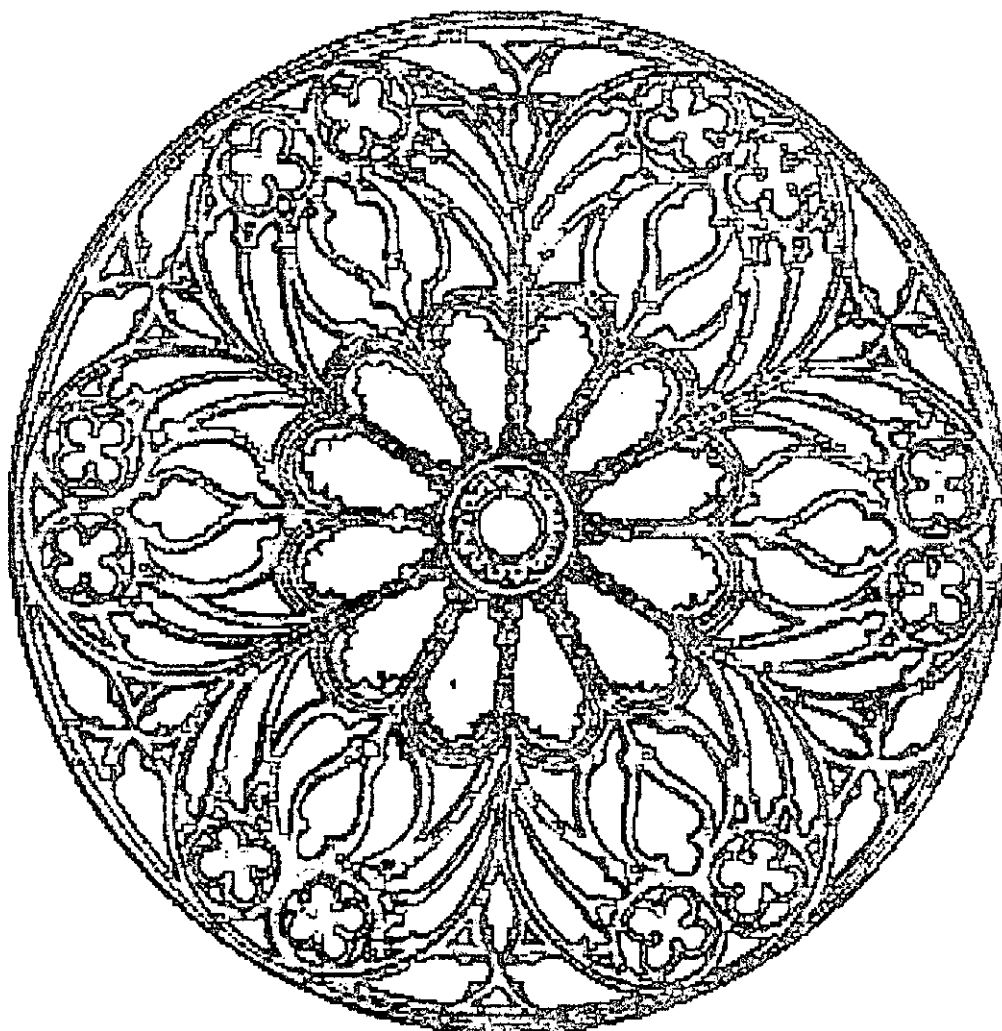
Bioelectrodos enzimáticos comerciales (Yellow Springs Instruments Inc); (28).

| Analito diana | Enzima inmovilizada                    | Muestra   |
|---------------|--|---|
| Glucosa       | Glucosa oxidasa                        | Sangre completa, suero, alimentos y bebidas, medio de fermentación. |
| Sucrosa       | Glucosa oxidasa, invertasa, mutarotasa | Alimentos y bebidas, monitoreo de aguas residuales.                 |
| Lactato       | Lactato oxidasa                        | Sangre completa, suero, alimentos y bebidas, medio de fermentación. |
| Galactosa     | Galactosa oxidasa                      | Alimentos y bebidas.  |
| Lactosa       | Galactosa oxidasa                      | Alimentos y bebidas.  |
| Glutamato     | Glutamato oxidasa                      | Alimentos y desarrollo biotecnológico                               |
| Glutamina     | Glutamato oxidasa, glutaminasa         | Alimentos, desarrollo biotecnológico y farmacéutico.                |
| Etanol        | Alcohol oxidasa                        | Industria vitivinícola  |
| Colina        | Colina oxidasa                         | Alimentos (fórmulas infantiles)                                     |

Antecedentes  
Importancia de la determinación del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )  
como analito y en sistemas biosensores electroquímicos

---

Una desventaja que presentan estos sistemas biosensores en su uso es la especificidad de los mismos, ya que aunque tales bioelectrodos contienen enzimas cuyos sustratos son específicos, el electrodo de trabajo de platino puede responder a diversas sustancias redox (6), cuando estas son capaces de atravesar la membrana del electrodo que confina al enzima, lo anterior implica diversas interferencias en el análisis de muestras con matrices complejas.



## 2.5. Biosensores selectivos a peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) basados en la inmovilización de enzimas peroxidadas.

Dada la poca selectividad que presenta un electrodo de trabajo de platino en un biosensor enzimático para la cuantificación de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), se ha buscado su rastreo con el uso de enzimas que actúen específicamente con dicha sustancia, así tienen su empleo las peroxidadas.

Las peroxidadas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y se encuentran clasificadas como oxidoreductasas (E.C.1.11.1.X.; donde X está determinado por un reductor biológico). Especialmente las peroxidadas que contienen el compuesto hemo, se encuentran divididas dentro de dos familias; de acuerdo al origen de las mismas se tienen a las peroxidadas de tipo vegetal y animal; (30).

| Peroxidasas animales       | Peroxidasas vegetales            |
|----------------------------|----------------------------------|
| Mieloperoxidasa            | Peroxidasa del citocromo c (CCP) |
| Lactoperoxidasa            | Ascorbato peroxidadas            |
| Peroxidasa tiroidea        | Peroxidasas fúngicas             |
| Prostaglandin H peroxidasa | Peroxidasas vegetales clásicas   |

Estas enzimas redox son capaces de transmitir directamente la señal de transducción al electrodo de trabajo cuando interactúan con su sustrato. Dentro de la literatura consultada se encuentra que la peroxidasa de rábano es la más ampliamente usada, no únicamente en biosensores para la determinación de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), sino también para biosensores que siguen como señal de transducción la cuantificación de dicho analito y cuya finalidad es determinar compuestos diferentes a éste. Así se tienen:

### 2.5.a. Biosensores elaborados con electrodos modificados con mediadores electrónicos y la enzima peroxidasa pura.

Tales electrodos pueden ser de grafito, oro, platino o carbón vítreo y pueden contener uno o más medidores electrónicos. La enzima en tales electrodos se encuentra ya sea adsorbida, en solución e inmovilizada mediante una membrana de diálisis (de nitrocelulosa, nylon, nylon con carga positiva, poli-ionicas, etc.) o bien inmovilizada en glutaraldehído, cistamina, silica gel, entre otras sustancias; (32-48).

### 2.5.b. Biosensores basados en polímeros electroactivos y la enzima peroxidasa pura.

La enzima en éste tipo de biosensores es intergrada en el polímero a través de métodos como la deposición potencioestática sobre el polímero, electropolimerización y a través de la unión facilitada por un mediador electrónico. Los polímeros más empleados son los polipirroles, polianilinas, poliaminoácidos (poli-L- lisina)-o-fenilenediamina, poli(4 vinilpiridina), poli(vinilalcohol), entre otros; y pueden emplearse solos o en combinación (38,41,44-46,54-65).

### 2.5.c. Biosensores a base de composites modificados y la enzima peroxidasa pura.

Los composites se encuentran constituidos por un porcentaje variable de grafito y otras sustancias como aceite o grasa de silicón, parafina, resina (siendo la resina epóxica la más común) y uno o más mediadores electrónicos(37,44,66-72).

#### 2.5.d. Biosensores basados en electrodos de pasta de carbón y la enzima peroxidasa pura o integrada en un tejido particular.

Se emplean en éste tipo de biosensores tejidos íntegros sin tratamiento previo, tales como células sanguíneas, raíces vegetales (tabaco, rábano, por ejemplo), piel animal, entre otros (59-61,73-82).

A pesar de esta clasificación, se encuentran en la bibliografía consultada, biosensores que emplean una combinación de los elementos anteriores: polímeros sobre electrodos modificados, composites o pasta de carbón con una o más enzimas y mediadores electrónicos, (37,38,41,44,45,59-61) y también se hallan descritas otras sustancias inorgánicas -azul de Prussia- y orgánicas -un nanopéptido hemo- que presentan actividad de peroxidasa pero no proporcionan selectividad en el análisis; (33, 34).

Se utilizan comúnmente como mediadores electrónicos sustancias como hidroquinona, o-fenilenediamina, tionina, tetracianoquinodimetano (TCNQ), tetratiófulvaleno (TTF), ferroceno, dimetilferroceno, colorantes (azul de metileno, verde de metileno, azul de toluidina, azul de Prussia) y tintas para impresión, fosfato de zirconio, compuestos politungstofosfatados ( $P_2W_{17}$ ) o polypaladiofosfatados ( $P_2Pd_{17}$ ), níqueloceno, óxidos metálicos (de titanio (II), de estaño (II), de manganeso (II), de cobalto (II), de hierro (II), de níquel (II), de plomo (II), de cerio (II), de cromo (III), de indio (IV), de talio (I), de osmio (II)).

Es importante hacer notar que un 98% de los biosensores descritos efectúan un análisis de tipo amperométrico, 1.5% utilizan transductores ópticos y sólo un 0.5% emplean la potenciometría como método de detección y determinación.

La linealidad encontrada para los biosensores descritos, se encuentra generalmente en el intervalo de  $10^{-4}$  a  $10^{-7}$  mol de  $H_2O_2$ ; en tanto que los límites de detección se hallan en el rango de  $10^{-6}$  a  $10^{-7}$  mol  $H_2O_2$ , en la bibliografía consultada de los últimos doce años. El tiempo de respuesta se encuentra entre 3 y 10 minutos y es inmediato en pocas ocasiones. En el caso de los biosensores enzimáticos comerciales el intervalo de linealidad en la concentración es de  $10^{-2}$  a  $10^{-7}$  mol  $H_2O_2$  y el tiempo de respuesta es de 30 segundos; (87).

No obstante, la amplia aplicación que ha encontrado la peroxidasa de rábano (HRP) dentro del campo de los biosensores selectivos a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el mecanismo de acción de tal enzima proporciona una desventaja intrínseca al uso de la misma:

Mecanismo de reacción para el enzima HRP:



Del mecanismo del enzima HRP puede observarse que en las reacciones (a) y (b) se obtienen complejos de HRP con oxígeno, los cuales son reducidos en el transductor de un

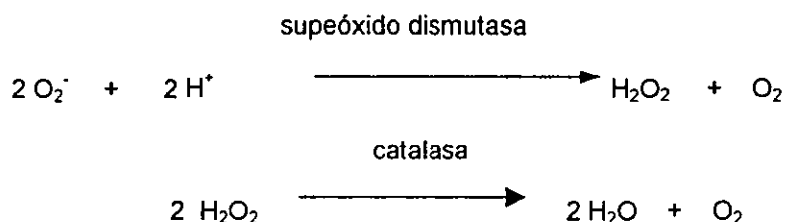


Antecedentes  
Biosensores selectivos a peróxido de hidrógeno ( H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> )  
basados en la inmovilización de enzimas peroxidadas.

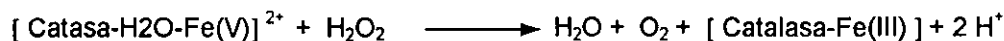
---

biosensor común por aceptación de electrones originando la respuesta eléctrica esperada. A bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), la reacción (a) determina la velocidad de la reacción, así la respuesta será proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Sin embargo, a altas concentraciones del analito, las reacciones (b) y (c) son las que determinan la velocidad de la reacción y por tanto, la respuesta de saturación del enzima. De éste modo en la región de saturación (máxima respuesta), la respuesta depende de la concentración de protones presente en el microambiente vecino al enzima y por tanto, el límite de sensibilidad al compuesto de interés dependerá de un posible cambio en el pH. Esto puede afectar no solo las propiedades de la enzima HRP, sino también al electrodo.

Otra enzima con potencial uso en el diseño de biosensores cuya señal de transducción es el seguimiento del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), es la catalasa, la cual en forma natural interviene en la defensa de la mayor parte de los organismos contra el anión radical superóxido, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, un producto de elevada toxicidad producto de la oxidación metabólica de lípidos y carbohidratos (9). Es la enzima superóxido dismutasa la que actúa en primera línea contra O<sub>2</sub><sup>-</sup>, debido a que utiliza como sustrato a éste radical transformándolo a peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el cual, es todavía considerablemente tóxico para las células. La catalasa descompone dicho peróxido a agua y oxígeno (84 y 85):



Mecanismo de reacción para el enzima Catalasa (CAT):



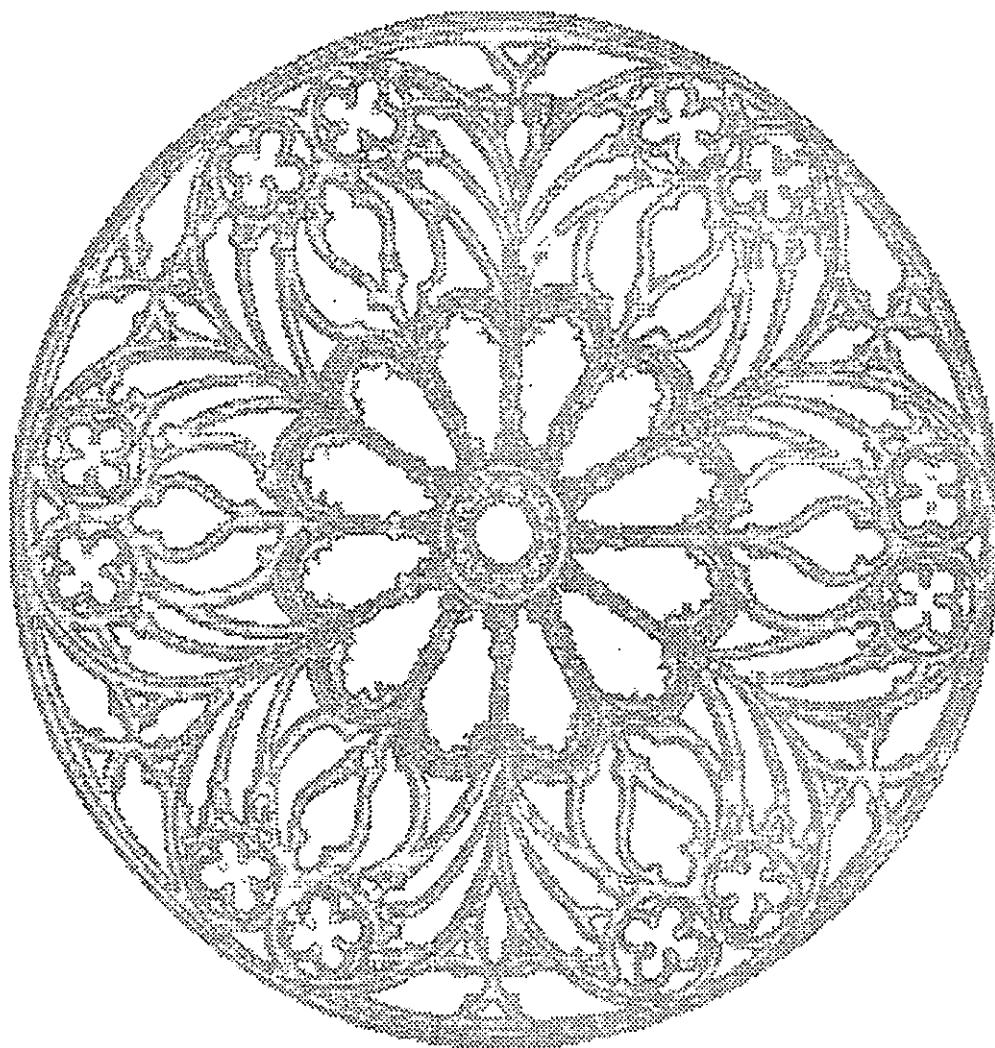
En la segunda reacción descrita arriba, el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) no solo actúa como un oxidante sino también como un reductor. Lo anterior es posible gracias a un mecanismo que involucra dos pasos y a la misma enzima. En el primer paso, una molécula de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) es reducida a agua, mientras que la catalasa es oxidada a lo que se denomina Complejo I. En seguida, una segunda molécula de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) es oxidada en un segundo paso y el Complejo I es reducido regenerando de nuevo al enzima catalasa (84 y 85):

Lo anterior justifica las ventajas del enzima Catalasa sobre el uso de HRP en un biosensor, dado que su mecanismo de reacción permite cambios mínimos en la cantidad de protones en el medio,

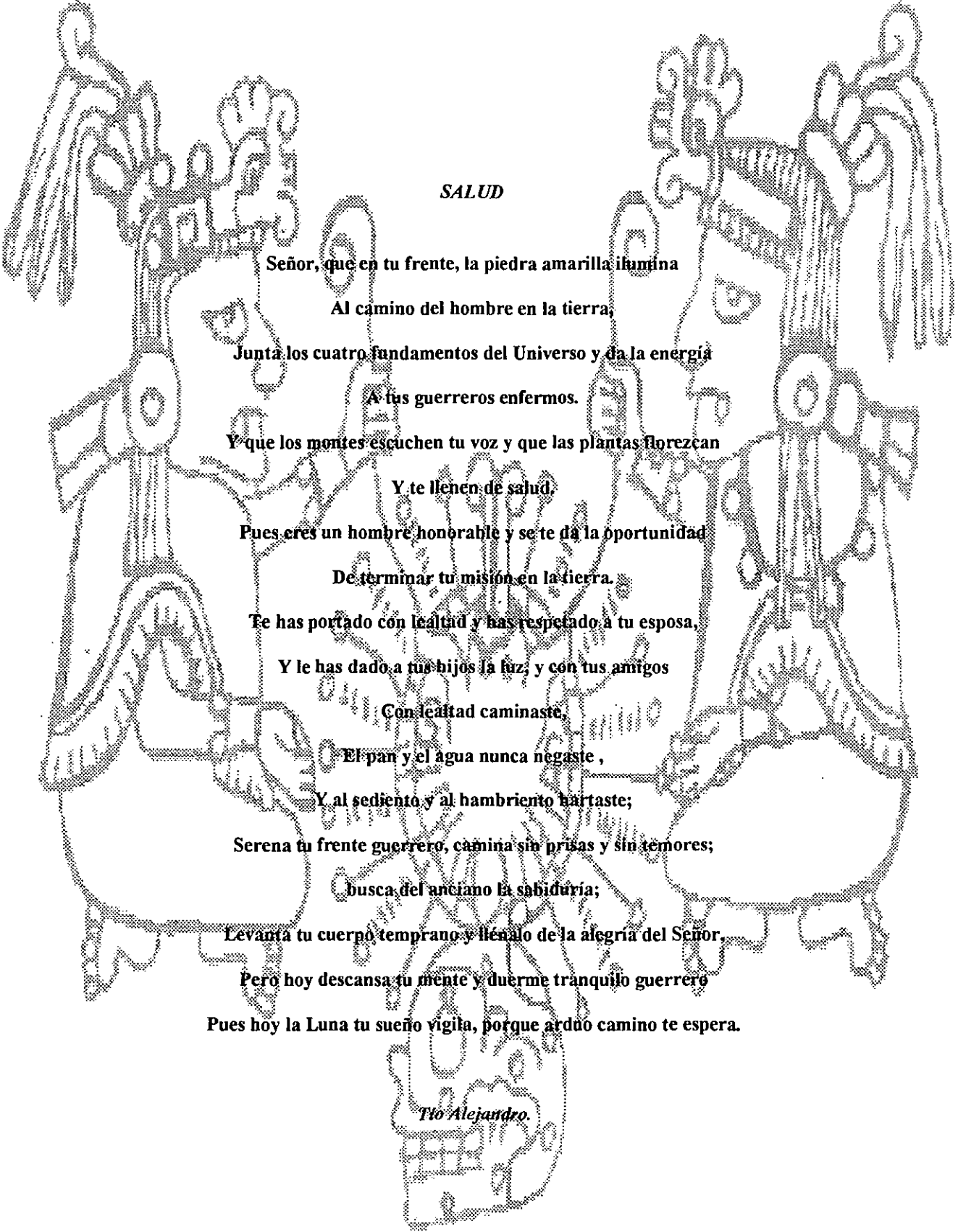
Antecedentes  
Biosensores selectivos a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )  
basados en la inmovilización de enzimas peroxidadasas.

---

lo anterior permite una mayor estabilidad en la enzima y por tanto en la repuesta de un biosensor selectivo a peróxido de hidrógeno, por lo que éste mostrará un mejor desempeño; (83). Sin embargo, los biosensores que utilizan catalasa escasean y se encuentran combinados, además, con otra enzima (HRP) – con una linealidad de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  y con un límite de detección de hasta  $10^{-8}$  mol de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) - o bien dentro de tejidos o células intactos (tejido de papa cruda, eritrocitos), con linealidad de  $2 \cdot 10^{-4}$  a  $4 \cdot 10^{-3}$  y límite de detección de  $5 \cdot 10^{-5}$  mol de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ); (83,86).



**SALUD**



Señor, que en tu frente, la piedra amarilla ilumina  
Al camino del hombre en la tierra,  
Junta los cuatro fundamentos del Universo y da la energía  
A tus guerreros enfermos.  
Y que los montes escuchen tu voz y que las plantas florezcan  
Y te llenen de salud,  
Pues eres un hombre honorable y se te da la oportunidad  
De terminar tu misión en la tierra.  
Te has portado con lealtad y has respetado a tu esposa,  
Y le has dado a tus hijos la luz, y con tus amigos  
Con lealtad caminaste,  
El pan y el agua nunca negaste,  
Y al sediento y al hambriento hartaste;  
Serena tu frente guerrero, camina sin prisas y sin temores;  
busca del anciano la sabiduría;  
Levanta tu cuerpo temprano y llénalo de la alegría del Señor,  
Pero hoy descansa tu mente y duerme tranquilo guerrero  
Pues hoy la Luna tu sueño vigila, porque arduo camino te espera.

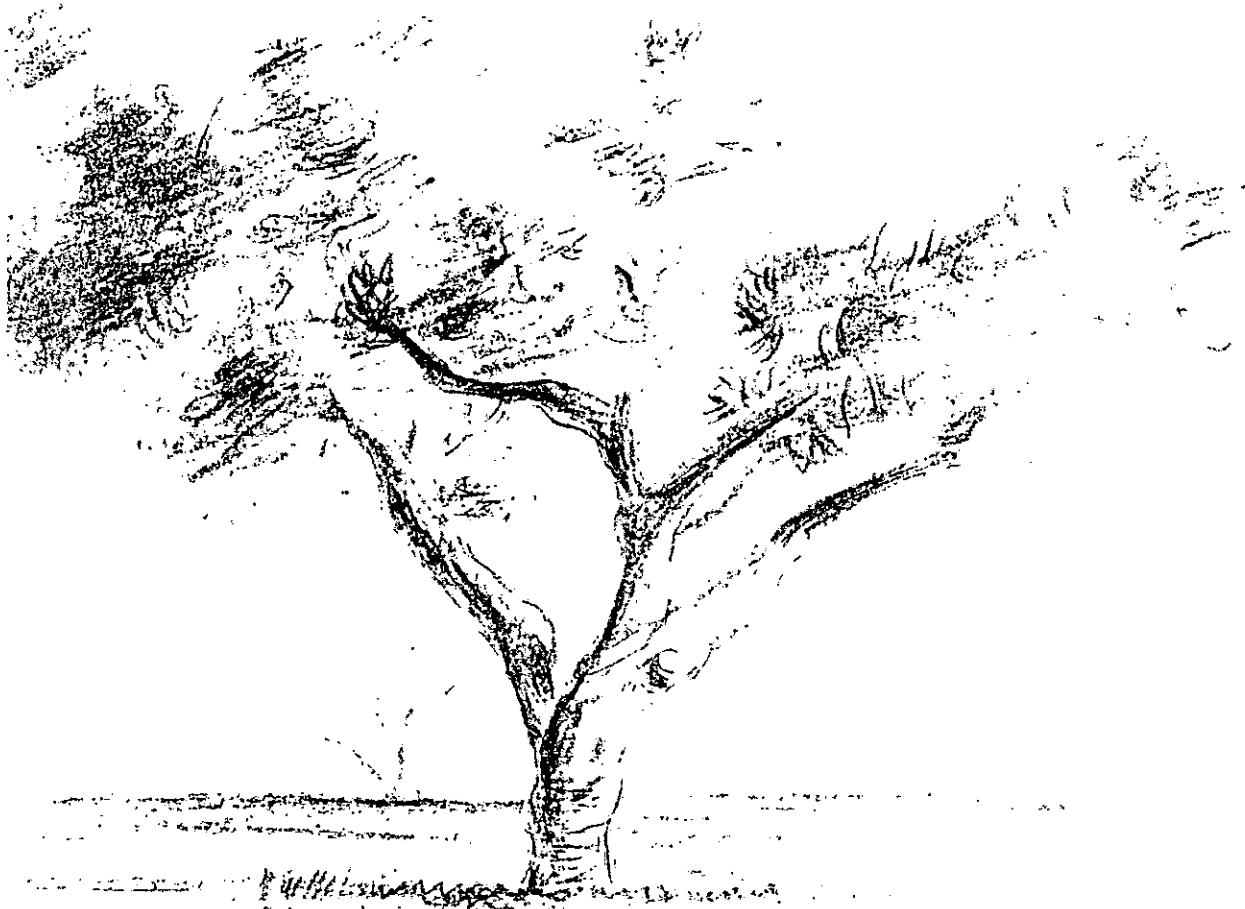
*Tío Alejandro.*



## 3. Objetivos

---

- Desarrollar un biosensor combinado miniaturizado económico, de fácil montaje y manejo, selectivo a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) con potencial aplicación a la docencia.
- Disminuir con la sustitución del método volumétrico por el potenciométrico, la generación de residuos contaminantes.
- Proponer un prototipo electroquímico como método de cuantificación para peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) alternativo al volumétrico en el cual, la manipulación de la muestra evite pérdidas en el analito y por ende resultados erróneos en la determinación de su concentración.



No ocultaré una ciencia que me ha sido revelada por gracia de Dios, no la guardaré celosamente para mí solo, por temor a atraer su maldición. ¿Cuál es la utilidad de una ciencia conservada en secreto, de un tesoro escondido? La ciencia que he aprendido sin ficciones, os la transmito sin pena. La envidia lo transtorna todo, un hombre envidioso no puede ser justo ante Dios. Toda ciencia y toda Sabiduría provienen de Dios; es decir que procede del Espíritu Santo, es esencialmente un modo de expresarse. Nadie puede decir: Nuestro Señor Jesucristo sin indicar implícitamente: hijo de Dios Padre, por operación del Espíritu Santo. De igual manera esta ciencia de verdad no puede ser separada de Aquél que me la ha comunicado.

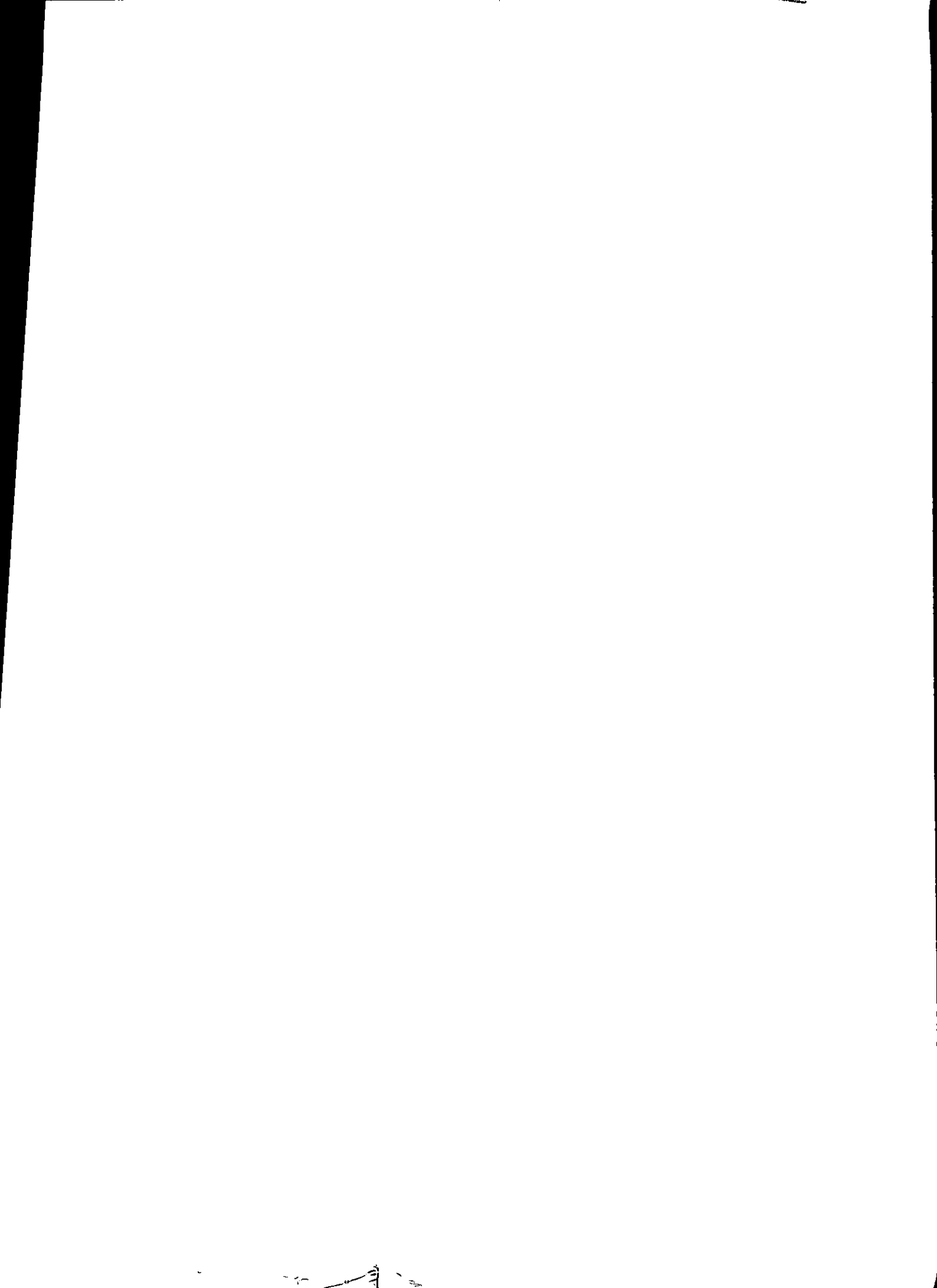
No he sido enviado para todos, sino tan sólo para quienes admiran al Señor en sus obras y a los que Dios ha juzgado dignos. Que quien tenga oídos para oír esta comunicación divina, recoja los secretos que me fueron transmitidos por la gracia de Dios y que no los revele jamás a quienes son indignos de ellos.

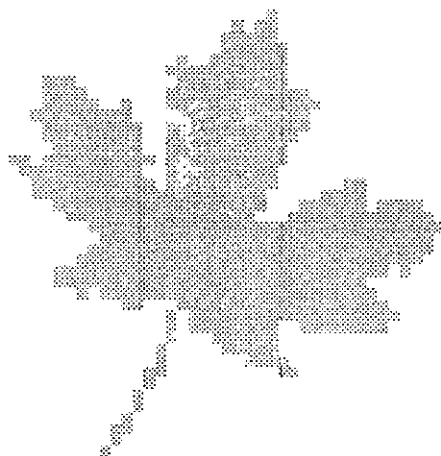
La naturaleza debe servir de base y de modelo a la ciencia, por eso el Arte trabaja de acuerdo con la Naturaleza en todo lo que puede. Por tanto, es menester que el artista observe la Naturaleza y opere como ella opera.

*El compuesto de los compuestos.  
Alberto el Grande.*

“Sé, pues, prudente; porque si has ejercido la sutileza y diafanidad de tu mente en lo que te he mostrado, advertirás que te he revelado manifiestamente el conocimiento de la Materia, ahora posees esa cosa, inefable y deleitable, objeto de todos los deseos de los filósofos.”

*El espejo de la Alquimia.  
Roger Bacon*



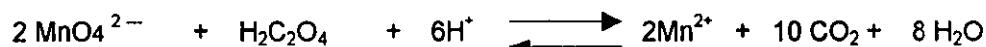


## 4. Desarrollo experimental

4.1. Determinación de la concentración de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, marca "Alcomex") de la muestra problema mediante el método tradicional de la volumetría. Para tal fin se realiza:

4.1.1. Preparación de una disolución 0.01F de permanganato de potasio (KMnO<sub>4</sub>, Baker Analyzed).

Titulación de la disolución de permanganato de potasio (KMnO<sub>4</sub>, ~ 0.1 M) usando como patrón primario oxalato de sodio (Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> desecado en estufa, Analar), a propósito de la reacción:



4.1.2. Valoración del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) usando como patrón secundario permanganato de potasio (KMnO<sub>4</sub>) en base a la reacción siguiente:



4.2. Preparación de estándares y problemas.

A partir de una solución de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, marca "Alcomex") y de su concentración ya determinada, se realizan los cálculos para la preparación de ocho estándares de concentración 10<sup>-x</sup> M (en donde x= 1,2,...,8). Las debidas diluciones para estándares y problemas se llevaron a cabo usando una solución tamponada de fosfatos (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> de J.T. Baker, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> de Quimica JVC) de concentración analítica 20mM a pH 7.

### 4.3. Fabricación y montaje de la unidad miniaturizada con el biosensor combinado selectivo a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

Para el desarrollo de una unidad para la cuantificación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) debieron realizarse varias pruebas primero con diversos transductores (utilizando alambre de cobre, un disco de cobre unido a un alambre de cobre y alambre de acero inoxidable) y segundo con diversos prototipos para después proceder a miniaturizar el biosensor combinado. La fabricación de tales prototipos, se describen a continuación:

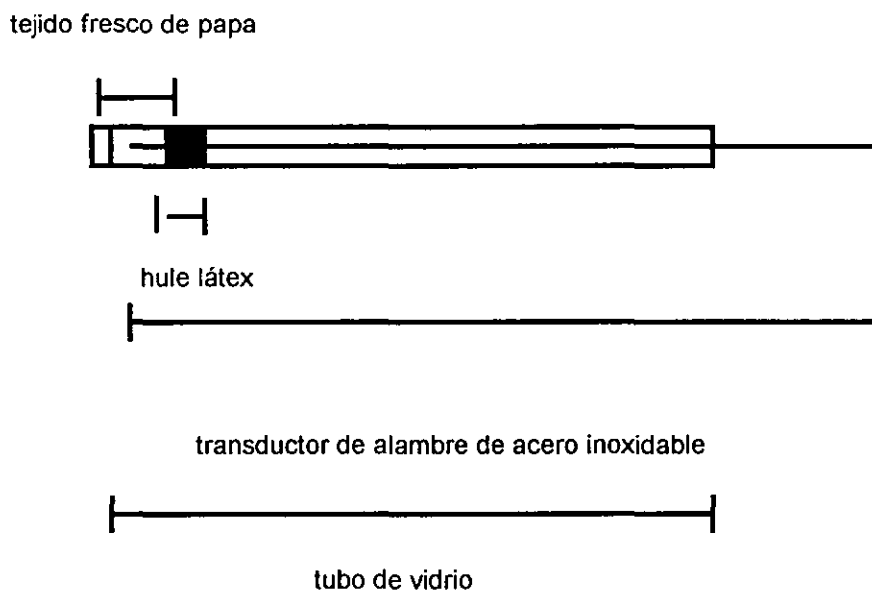
#### 4.3.1. Biosensor selectivo a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) elaborado con tejido fresco de papa y usando como transductor alambre de acero inoxidable.

Para montar este biosensor se empleó el siguiente material:

- tubo de vidrio (8.5 cm de largo por 9/7 mm de diámetro externo/interno).
- alambre de acero inoxidable (14.5 cm de largo).
- tapón de hule látex (7mm de grosor por 7 mm de diámetro).
- tejido fresco de papa.

El montaje del biosensor se ilustra en la *figura A*:

- *Figura A.* Montaje del biosensor con tejido fresco de papa:



#### 4.3.2. Biosensor selectivo a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) elaborado con extracto acuoso crudo de papa y empleando como transductor alambre de acero inoxidable.

##### 4.3.2.1 Extracto acuoso crudo de papa.

El extracto crudo de papa se prepara el mismo día de su uso y se obtiene de la siguiente manera: en un mortero se trituran en frío 5 g. de papa, el jugo obtenido de ésta forma se coloca en un tubo



de ensayo y centrifuga por tres minutos a 4000 rpm (en una centrífuga modelo 800 Angle Centrifuge de Shangai Surgical Instruments Factory), se decanta el sobrenadante y se pone en refrigeración hasta el momento de su utilización.

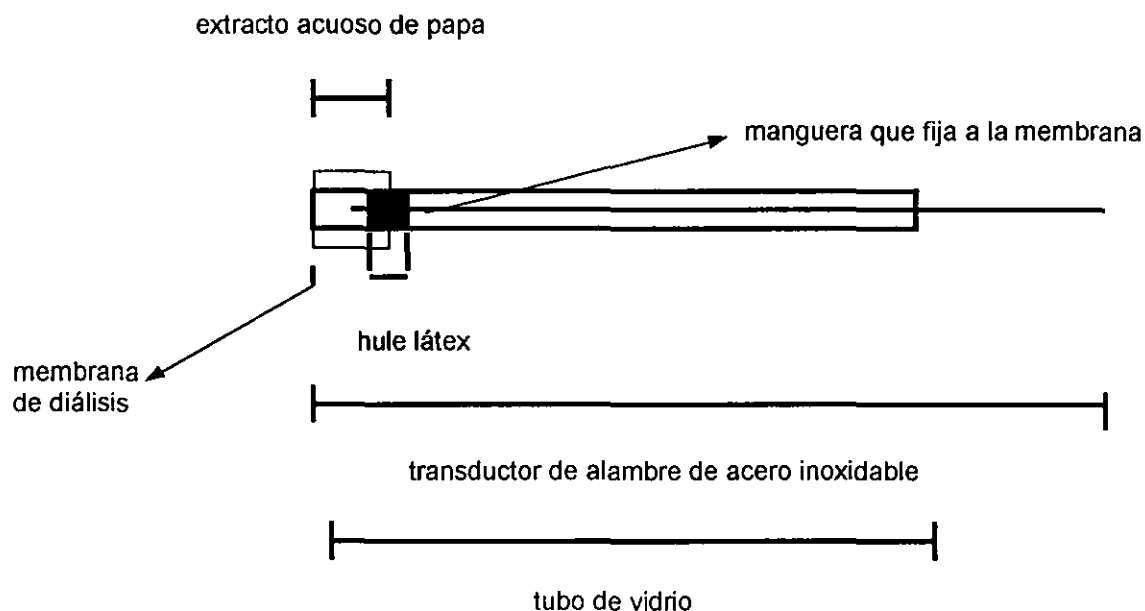
#### 4.3.2.2. Montaje del biosensor.

Se empleó el siguiente material:

- tubo de vidrio (8.5 cm de largo por 9/7 mm de diámetro externo/interno).
- alambre de acero inoxidable (14.5 cm de largo).
- tapón de hule látex (7mm de grosor por 7 mm de diámetro).
- extracto acuoso crudo de papa.
- manguera de hule (1cm de largo por 10/9 mm de diámetro externo/interno)
- membrana de diálisis (cuadro de 1.2cm por 1.2 cm)

La manera en que se montó el biosensor con extracto acuoso crudo de papa se muestra en la *figura-B*:

- *Figura B.* Montaje del biosensor con extracto de papa.



**4.3.3. Biosensor selectivo a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) elaborado con una solución concentrada de catalasa pura comercial y utilizando como transductor alambre de acero inoxidable.**

#### 4.3.3.1. Preparación de una solución concentrada de catalasa pura comercial.

Utilizando la mínima cantidad de solución amortiguadora de fosfatos 20 mM a pH 7 y enzima comercial (de hígado bovino, Sigma Chemical Company, lote 67F-7190) se prepara una solución concentrada de catalasa.

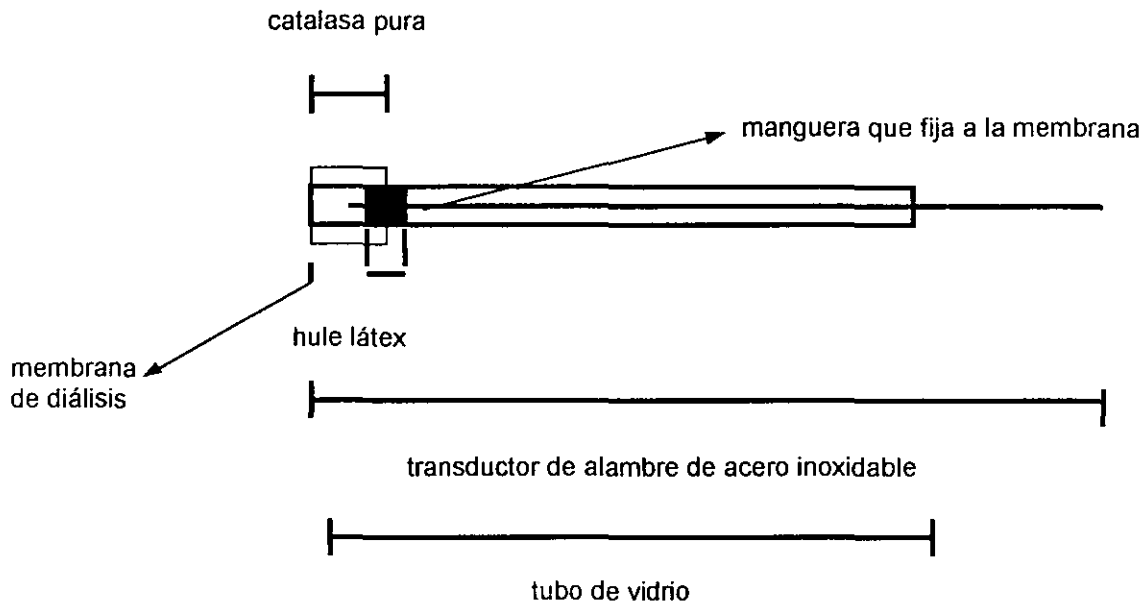
#### 4.3.3.2 Ensamblaje del biosensor.

Material requerido:

- tubo de vidrio (4 cm de largo por 4/2 mm de diámetro externo/interno).
- alambre de acero inoxidable (6 cm de largo).
- tapón de hule látex (7mm de grosor por 2 mm de diámetro).
- Pasta con catalasa pura comercial (Sigma Chemical Company).
- manguera de hule (1cm de largo por 5/3 mm de diámetro externo/interno).
- membrana de diálisis (cuadro de 6 mm por 6 mm).

La forma en que el biosensor con catalasa pura comercial se ensambla, se ilustra en la figura C:

- **Figura C.** Montaje del biosensor con catalasa pura.

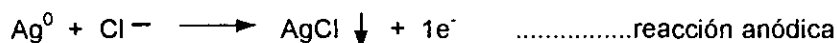


#### 4.3.3.3. Electrodo de referencia capilar con plata ( $Ag^0$ ) / cloruro de plata ( $AgCl$ )

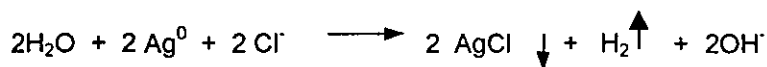
La elaboración del electrodo de referencia requirió los siguientes pasos:

##### 4.3.3.3.1 Electrodeposición de $AgCl$ , cloruro de plata sobre un alambre de plata.

En un vaso de precipitados de 100 mL se agregaron 70mL de una solución 0.1 Molar de  $KCl$  (Mallinckrodt). Enseguida se sumergió en dicha solución un alambre de plata de 6 cm de largo y una mina de carbón de igual longitud. Después se conectó el polo positivo de una pila alcalina de 9V (Panasonic) al alambre de plata y el negativo a la mina de carbón por espacio de cinco minutos o hasta que sobre el alambre de plata se forme una capa fina ( pero que no sea fácilmente desprendible ) de Cloruro de Plata ( $AgCl$ ) a propósito de la reacción:



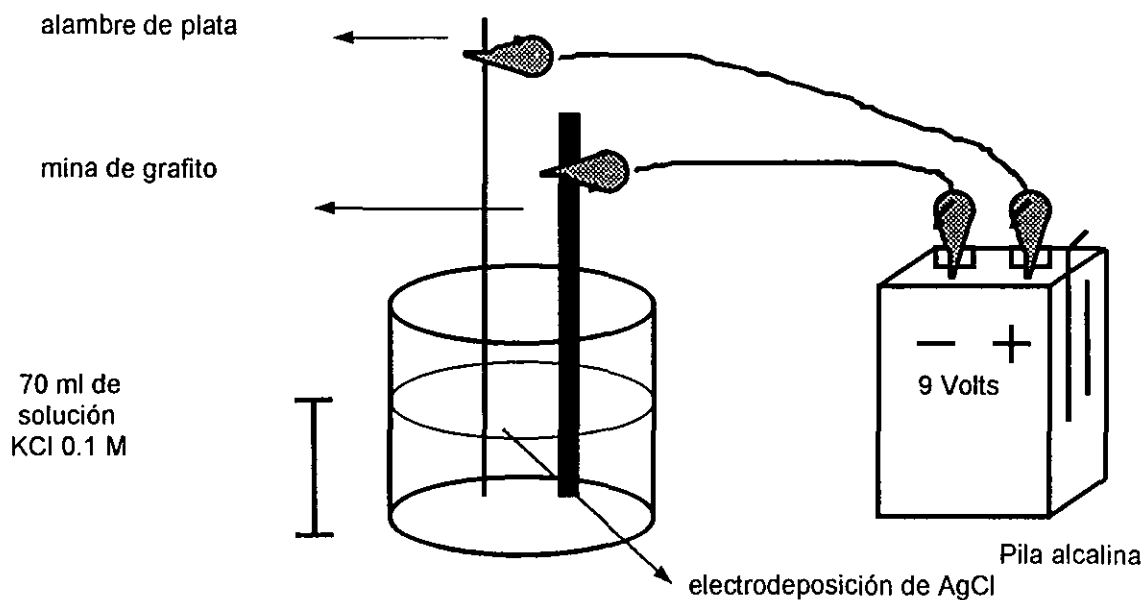
reacción global :



La electrodeposición se ilustra en la *figura D*:

- **Figura D.** Electrodo de referencia  $\text{Ag}^0/\text{AgCl}$ .

Electrodeposición de cloruro de plata( $\text{AgCl}$ ) sobre el alambre de plata  $\text{Ag}^0$ .



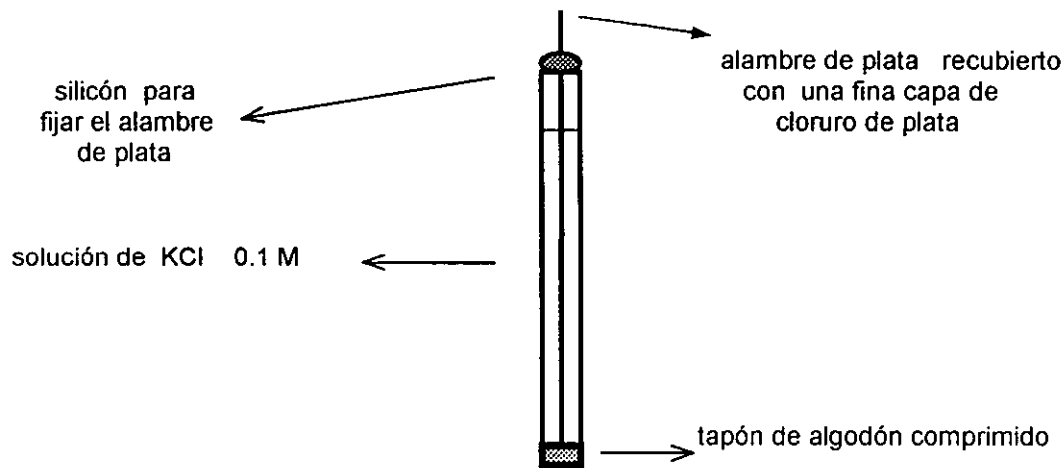
#### 4.3.3.3.2. Montaje del electrodo de referencia.

El material necesario:

- tubo de vidrio (4 cm de largo por 4/2 mm de diámetro externo/interno).
- alambre de plata con cloruro de plata (6 cm de largo).
- tapón de algodón comprimido (2mm de grosor por 2 mm de diámetro).
- Solución 0.1 Molar de KCl.
- Teflón.

La manera en que tal electrodo se ensambla, se demuestra en la *figura E*:

- **Figura E.** Montaje del electrodo de referencia  $\text{Ag}^0/\text{AgCl}$ .

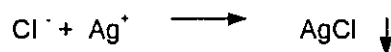


#### 4.3.4. Miniaturización del biosensor combinado selectivo a peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

##### Electrodo de referencia.

Todos los prototipos que a continuación se describen poseen el mismo electrodo de referencia, para el cual se elabora una pasta con cloruro de plata ( $\text{AgCl}$ ) en forma sólida y grafito en polvo (Aldrich) al 50% con nujol; el transductor en éste caso es alambre de cobre.

El cloruro de plata se obtuvo de la siguiente manera: en un tubo de ensayo se añadieron 3 mL de agua destilada a los cuales se agregaron 1 g. de cloruro de sodio cristalino ( $\text{NaCl}$ , Merck) a esta solución se añadieron 3 mL de una solución de nitrato de plata  $0.1 \text{ Molar}$  (solución volumétrica, Merck), a propósito de la reacción siguiente:



en seguida el contenido del tubo se centrifugó a 4000 rpm (en una centrífuga modelo 800 Angle Centrifuge de Shanghai Surgical Instruments Factory), durante tres minutos, a continuación se decantó el sobrenadante. Finalmente, el residuo correspondiente al  $\text{AgCl}$  precipitado, se seco en la estufa por espacio de cinco minutos.

##### 4.3.4.1. Primer prototipo miniaturizado.

Se utilizó el siguiente material:

- una placa de acrílico (2cm de ancho, 3 cm de largo y 2mm de espesor).
- alambre de acero inoxidable (5 cm de largo).
- alambre de cobre (5 cm de largo).
- membrana de diálisis (1cm de ancho por 1.5cm de largo).
- pasta con catalasa pura comercial.
- silicón.

## Desarrollo experimental

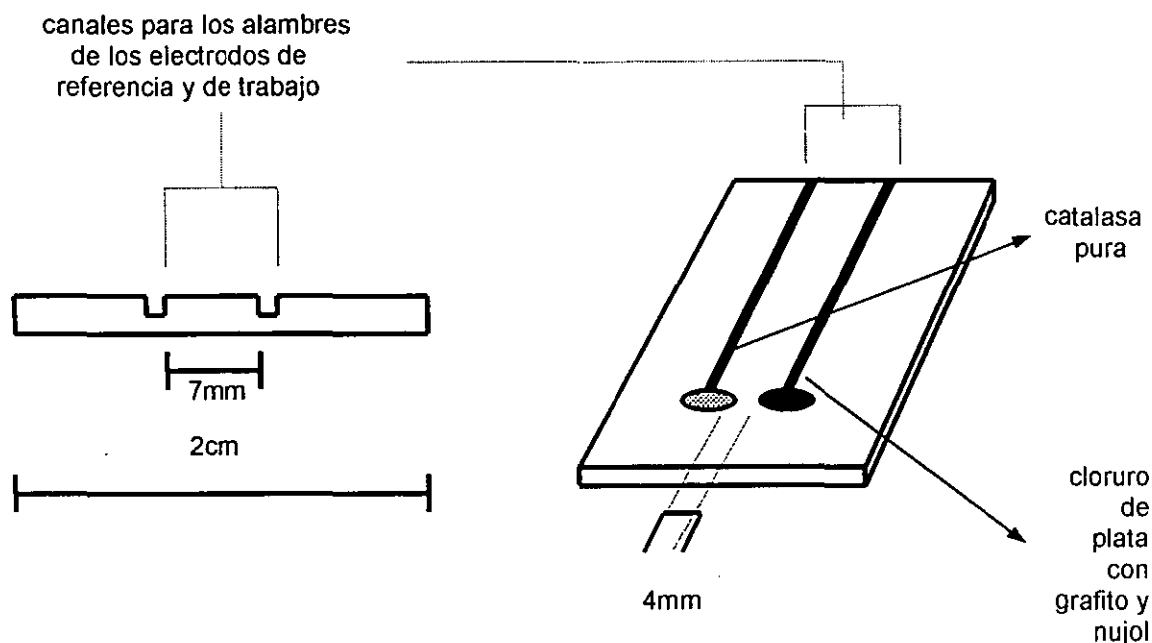
Mediante un minitaladro (marca Proskit, modelo PK-500) se formaron en la placa de acrílico dos pocitos de 3 mm de diámetro por 1 mm de profundidad y 4 mm de espacio entre ellos.

Estos pozos se destinan para contener, en uno la pasta de grafito, cloruro de plata (AgCl) y nujol, correspondiente al electrodo de referencia y en otro la solución concentrada de enzima correspondiente al biosensor. Partiendo de los pozos se encuentran dos canales con la profundidad suficiente para albergar los transductores tanto del biosensor como del electrodo de referencia.

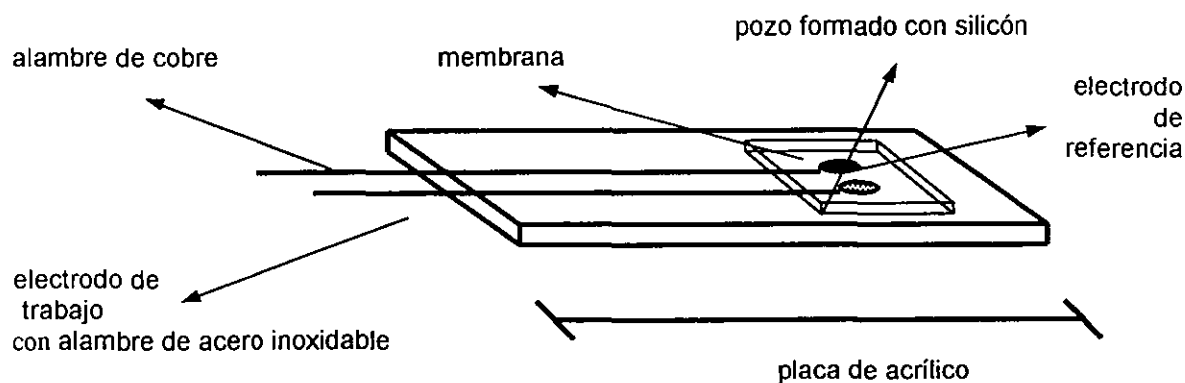
Una vez preparados los electrodos de referencia y de trabajo se coloca el pedazo de la membrana de diálisis sobre los pozos de estos; los bordes de la membrana se pegan y sellan a la placa de acrílico mediante silicón formando a la vez un pozo de 2mm de profundidad que será útil para que al colocar la muestra sobre la membrana para efectuar las correspondientes determinaciones no se derrame fuera de la unidad de análisis.

Se ofrece la imagen de la unidad del biosensor combinado en la *figura F*:

- **Figura F.** Primer prototipo



Unidad de determinación armada:



#### 4.3.4.2. Segundo prototipo.

Material requerido:

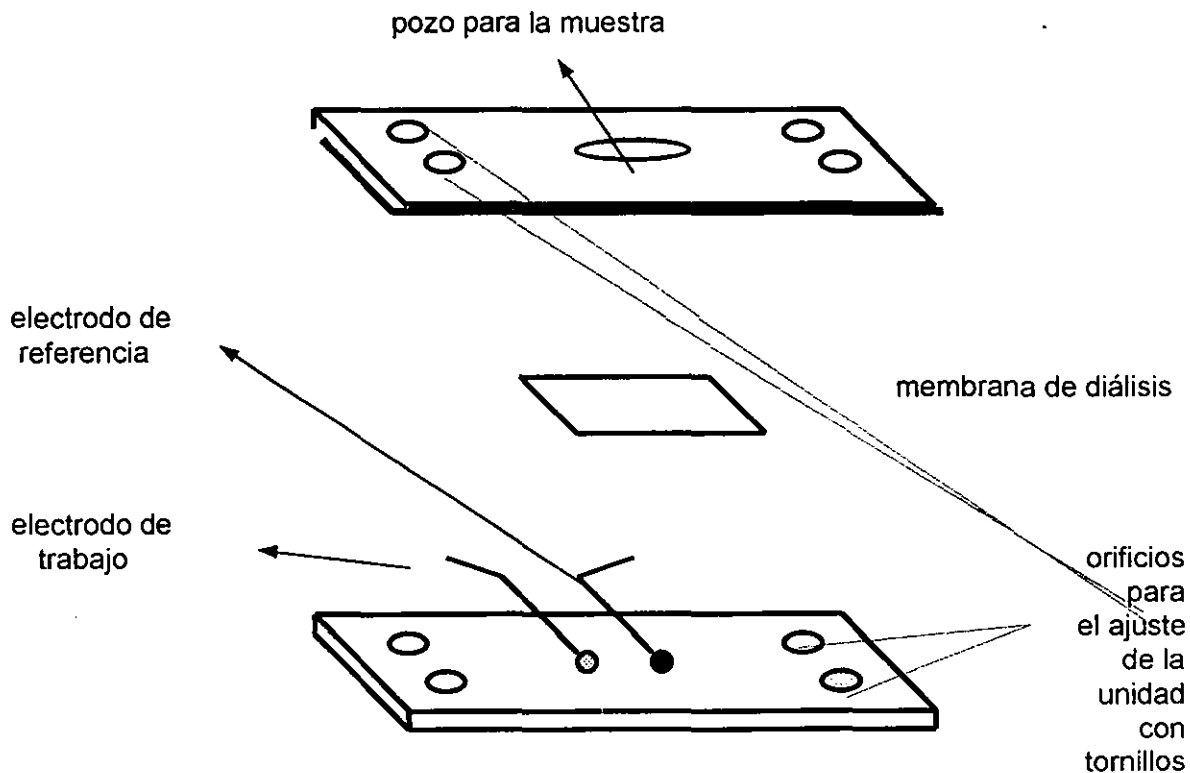
- dos placas de acrílico (2.5 cm de ancho, 3.5 cm de largo y 2mm de espesor).
- alambre de acero inoxidable (5 cm de largo).
- alambre de cobre (5 cm de largo).
- Cuatro tornillos con respectiva tuerca (7mm de diámetro por 15mm de largo)
- membrana de diálisis (1cm de ancho por 1.5cm de largo).
- pasta con catalasa pura comercial.
- silicón.

Al igual que para el primer prototipo, se hicieron en una de las placas, al centro, dos pozos de 3 mm de diámetro por 1mm de profundidad, pero con 1 mm de espacio entre ellos, lo mismo dos canales que parten de los pozos hacia la parte exterior del acrílico. En la otra placa en la misma posición se hace un orificio de 5 mm por 3 mm. Finalmente, en ambas placas fueron hechos cuatro orificios más alrededor de los pocitos para colocar los tornillos y fijar las dos placas, quedando en medio de estas la membrana de diálisis que cubre a los electrodos de referencia y de trabajo.

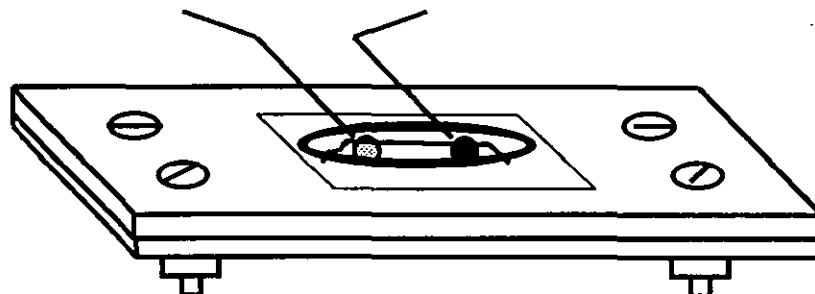
La manera en que se montó la unidad del biosensor combinado se ilustra en la *figura G*:

- *Figura G*. Segundo prototipo.

Segmentos de la unidad de determinación.



Unidad de análisis ensamblada.



#### 4.3.4.4. Tercer prototipo.

Material requerido:

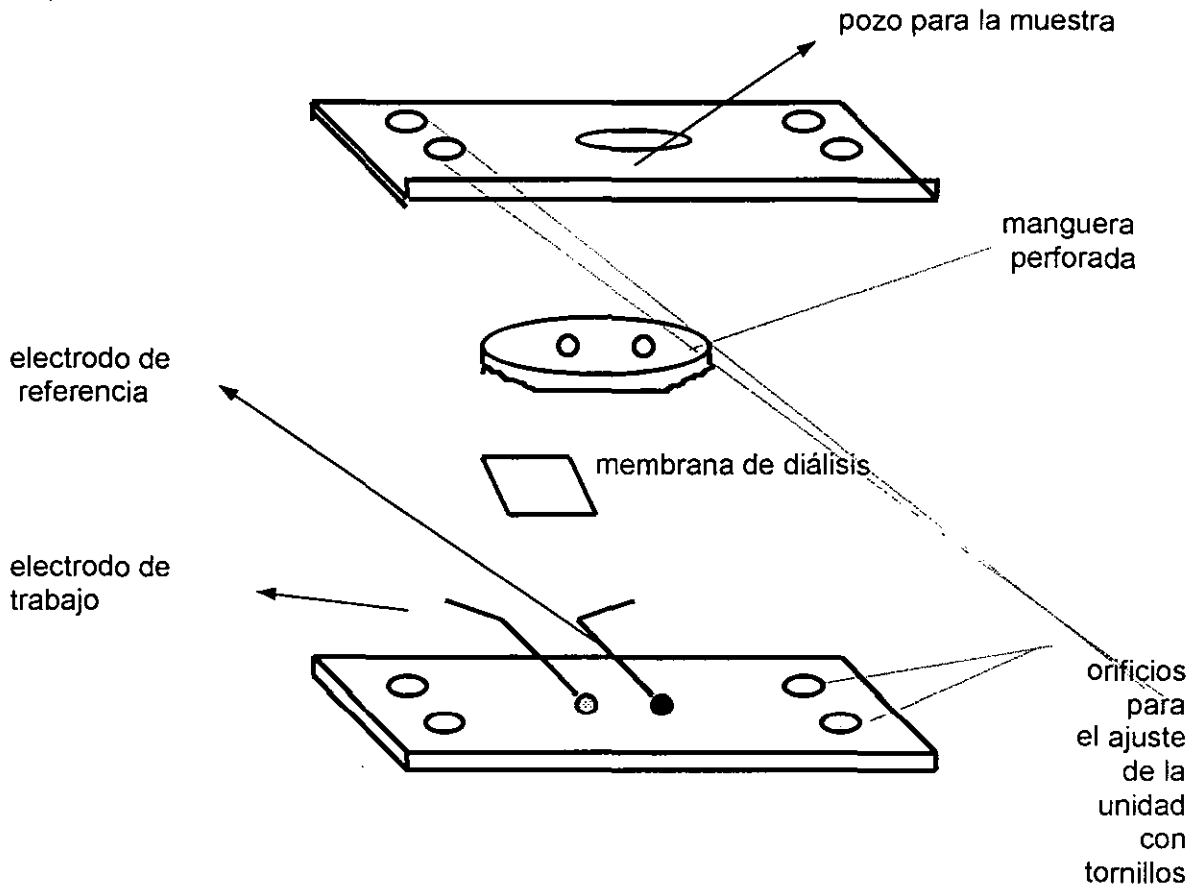
- dos placas de acrílico (2.5 cm de ancho, 3.5 cm de largo y 2mm de espesor).
- alambre de acero inoxidable (5 cm de largo).
- alambre de cobre (5 cm de largo).
- manguera transparente (cuadrado de 1cm por 1cm y 1 mm de grosor).
- cuatro tornillos con su respectiva tuerca(7mm de diámetro por 15mm de largo)
- membrana de diálisis (3mm de ancho por 4mm de largo).
- pasta con catalasa pura comercial.
- silicón.

A diferencia del segundo prototipo, en este diseño la membrana se mantiene fija mediante el pedazo de manguera, colocada entre las placas de acrílico. El pozo destinado para la muestra es aún más pequeño que el realizado en la anterior unidad de análisis. Los orificios creados para los electrodos siguen guardando entre sí 1mm de distancia.

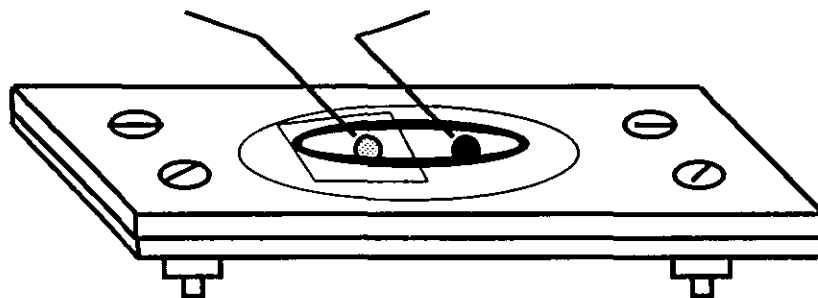
La forma en que se montó la unidad del biosensor combinado se presenta en la *figura H*:

• *Figura H.* Tercer prototipo.

Segmentos de la unidad de determinación.



Unidad de análisis ensamblada.

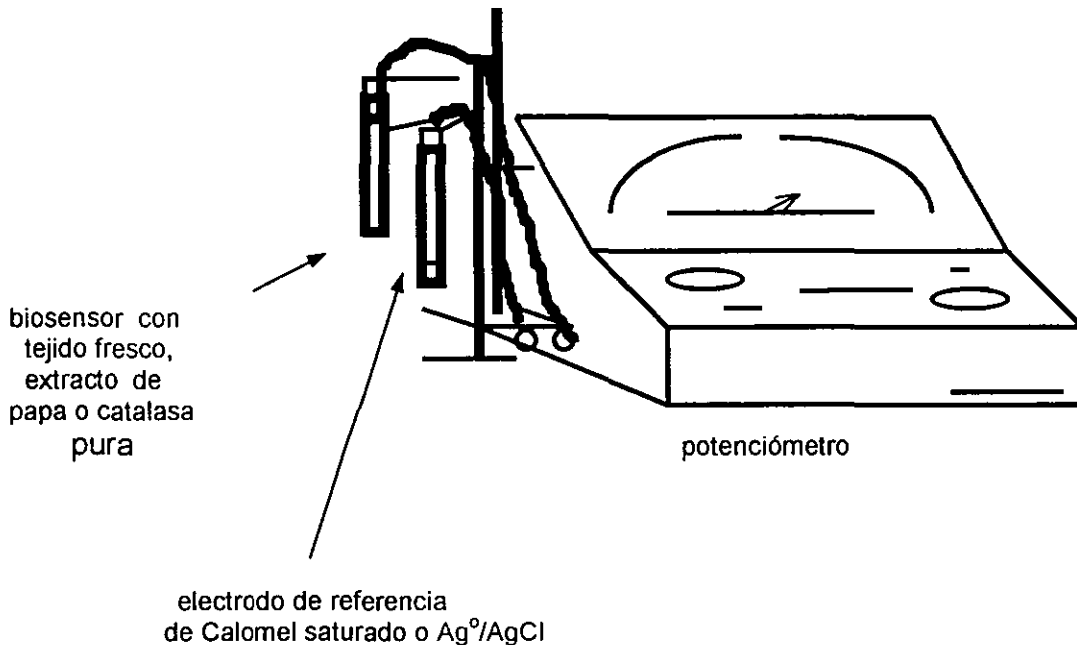




#### 4.4. Respuesta del biosensor.

Para determinar el desempeño de cada uno de los biosensores y biosensores combinados anteriores, se procedió a la determinación del potencial para cada uno de los estándares y de las soluciones problema.

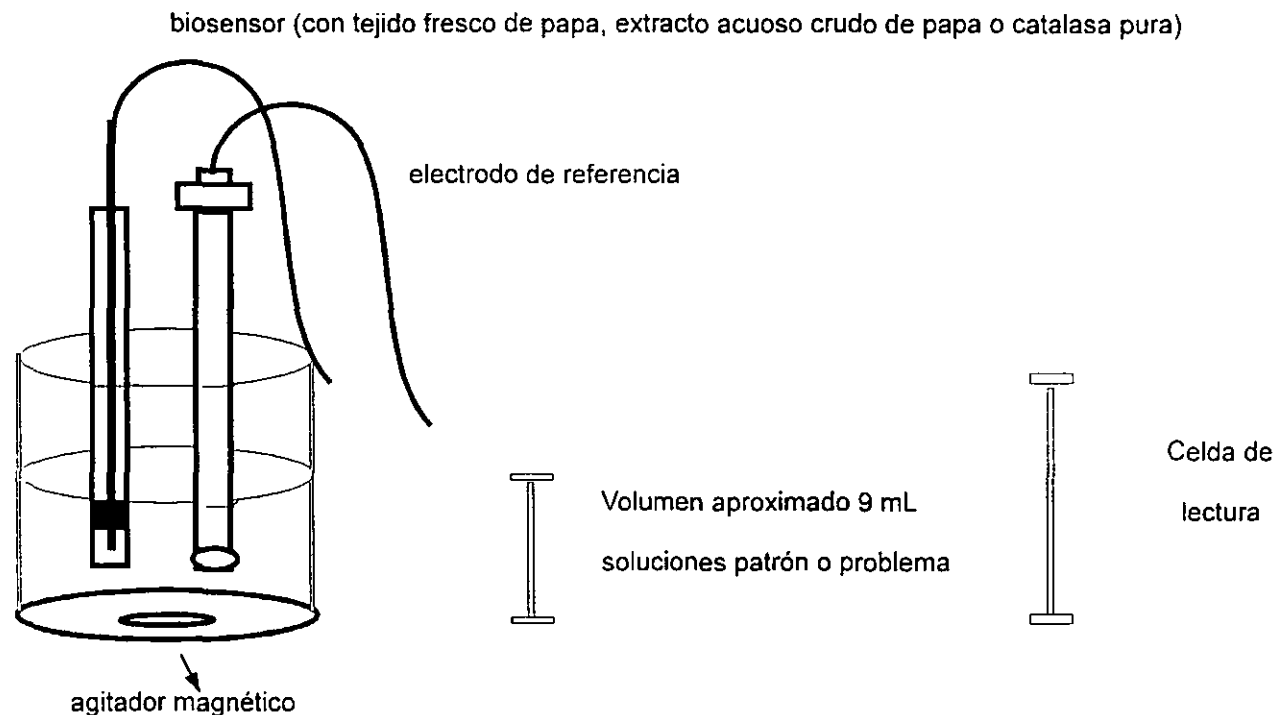
- **Figura I.** Conexión del biosensor al potenciómetro:



En el caso de los biosensores hechos con tejido fresco de papa extracto acuoso crudo de papa y con una solución concentrada de catalasa pura comercial, la determinación del potencial (*figura I*) se efectuó conectando dichos biosensores junto con el electrodo de referencia a un potenciómetro (modelo LSX de Sargent-Welch Scientific Company) e introduciéndolos en las correspondientes celdas con las soluciones patrón o muestras problema en agitación mediante una barra magnética pequeña (*figura J*).

Es importante aclarar que para los dos primeros biosensores, se utilizó un electrodo de referencia de calomel saturado (ESC) mientras que para el tercero se usó el electrodo de referencia de Ag/AgCl montado en el tubo de vidrio capilar (descrito anteriormente). Además entre lectura y lectura se lavaron tanto el biosensor como el electrodo de referencia con solución tamponada de fosfatos (20 mM, pH 7).

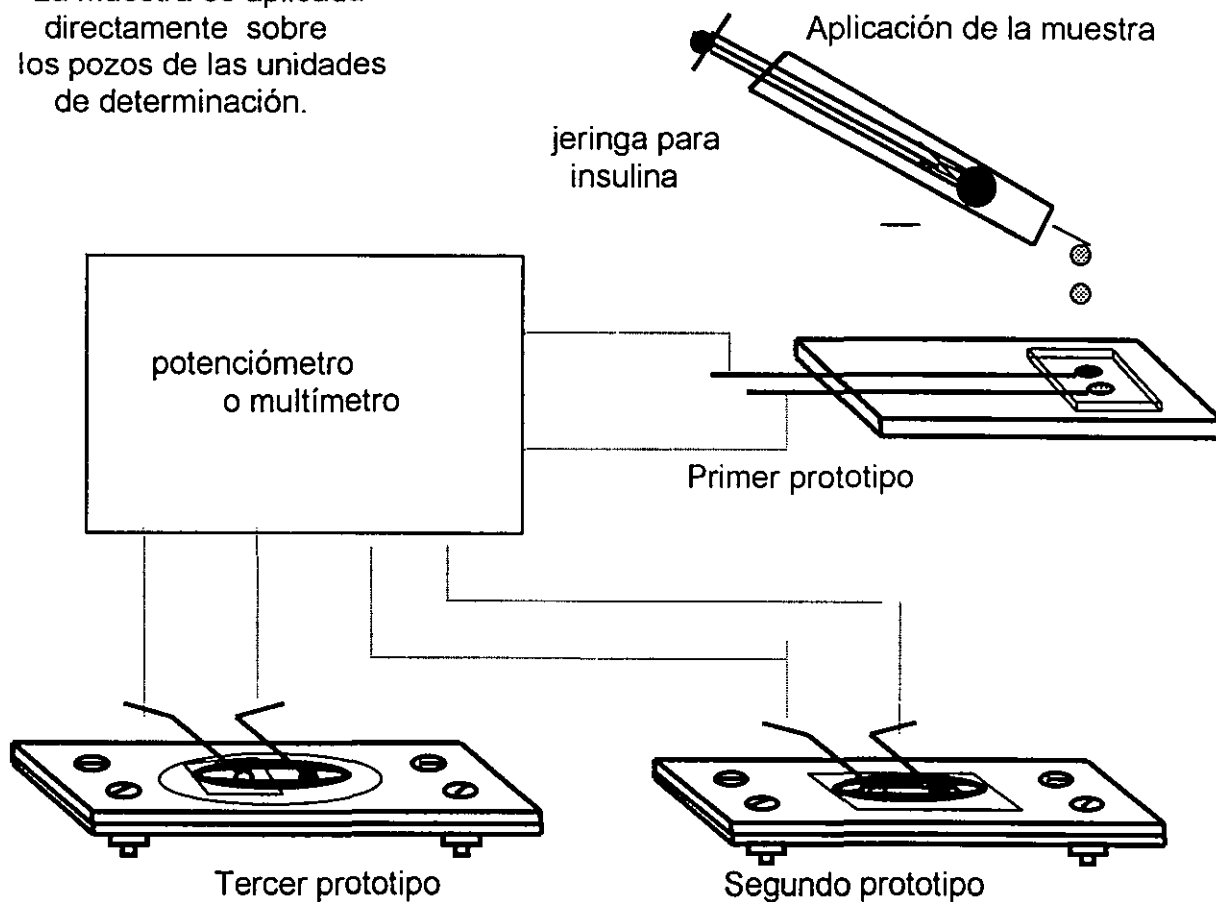
- **Figura J.** Determinación de potencial (biosensor con papa, extracto acuoso, catalasa pura)



Para los biosensores combinados, las muestras o estándares se colocaron directamente sobre el pocito de la unidad de cuantificación, mediante una jeringa para insulina (*figura K*). También después de cada lectura, se lavó el pocito con el buffer de fosfatos (20 mM, pH 7).

- **Figura K.** Determinación de potencial (biosensores combinados miniaturizados).

\*\* La muestra es aplicada directamente sobre los pozos de las unidades de determinación.



Volumen de muestra requerido para la determinación del potencial:

|                        |             |
|------------------------|-------------|
| Primer prototipo.....  | 300 $\mu$ L |
| Segundo prototipo..... | 64 $\mu$ L  |
| Tercer prototipo.....  | 19 $\mu$ L  |

*Bendita Mujer*

Hoy he visto el color del cielo  
y la Luna cuando las nubes cuelgan de ella.

He visto el color del cielo  
y las estrellas resplandecer.

He visto a nuestro Padrecito Sol  
y he tenido el calor que nos hace vivir.

He visto pasar un cometa  
y su brisa nos hace reverdecer.

He visto el negro de la noche  
y el fuego de un amanecer.

He escuchado el canto del censontli  
y me he prendado de él...

He visto una lluvia de estrellas  
y el rostro de una mujer.

He esperado cuatrocientos tiempos de mi vida  
y al fin te pude ver.

y de jade te he fabricado

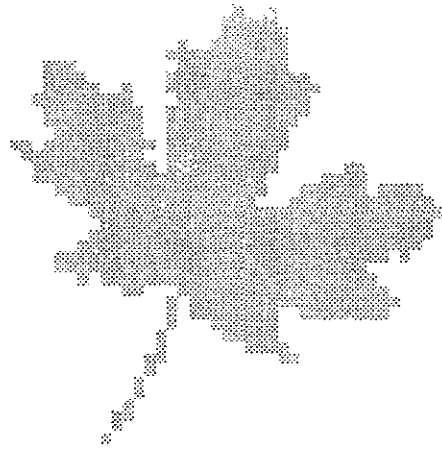
doncella un jaguar

que te ha de proteger

con sus garras doncella,

Bendita Mujer.

*Tío Alejandro.*



## 5. Metodología de procesamiento de datos

---

El tratamiento de los resultados experimentales obtenidos fue el siguiente:

5.1 Elaboración gráficas de potencial contra el menos logaritmo de la concentración de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ):  $E(mV) = f(-\log [H_2O_2])$ .

Partiendo de las gráficas anteriores determinó:

5.2 La posibilidad de describir una curva de calibración de acuerdo a las soluciones estándar empleadas y sus correspondientes potenciales obtenidos.

5.3 Identificar la zona de linealidad de tal curva de calibración obtenida e interpolar en ella el potencial de la solución "problema" para investigar su concentración. Determinar si es necesario conocer dicha concentración mediante el método de adiciones estándar.

5.4 Comparar la concentración de la solución problema obtenida mediante el biosensor con la obtenida por volumetría mediante el porcentaje de error (%Error) calculado de la siguiente manera:

$$\%Error = \frac{[H_2O_2]_v - [H_2O_2]_b}{[H_2O_2]_v}$$

en donde :

%Error : porcentaje de error.  
[  $H_2O_2$  ]<sub>v</sub> : [  $H_2O_2$  ] obtenida mediante volumetría.  
[  $H_2O_2$  ]<sub>b</sub> : [  $H_2O_2$  ] obtenida mediante el biosensor.

5.5 Concluir si el método de valoración propuesto proporciona una buena alternativa con relación a la volumetría.

*Rezaderos:*

-Que su jícara  
siempre tenga  
Agua

Que no se vuelva  
fiebre su maíz  
ni su bejuco

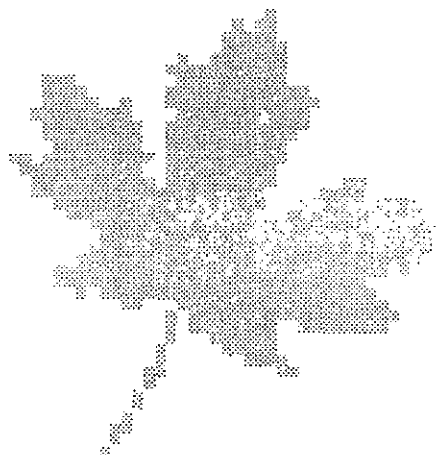
-Que no camine  
en balde bajo  
la Luna

Que nunca más  
la paja de la choza  
ahogue si respiro  
y que el incienso  
eleve su humo.

-Que no se pare  
la mariposa negra  
en su verdura.

Las piedras hambrientas  
cuidan desde ahora  
su pulso.

*Juan Bañuelos.*



## 6. Resultados experimentales

---

Una vez determinada la concentración del permanganato de potasio  $\sim 0.01\text{M}$  ( $\text{KMnO}_4$ ) por titulación con el patrón primario oxalato de sodio ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ), se valoró el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) comercial (Alcomex) disponible. Conocida entonces la concentración de ésta última solución, para cada uno de los experimentos, se realizaron los cálculos para la elaboración de las soluciones stock (ocho estándares de concentración  $10^{-x}\text{M}$  en donde  $x=1,2,\dots,8$ ) y problema.

### 6.1. Biosensor con tejido fresco de papa.

En un principio, no pudieron describirse curvas de calibración con el potencial de los estándares. Al repetir varias veces el ensayo se concluyó que la inexactitud del biosensor se debía al grosor del trozo de papa usado, ya que con pequeñas modificaciones de éste, el potencial determinado varía por mucho para un mismo estándar. La razón por la que se tenía dicha variación se debió a que al no observarse en determinado momento un cambio en el potencial, se cortaba una pequeña cantidad del tejido para regenerar la superficie del mismo y continuar así la determinación. Por lo anterior, se resolvió cuidar en futuros experimentos el grosor del tejido en el bioelectrodo.

Con respecto a los transductores probados para el bioelectrodo, se determinó que el alambre de acero inoxidable era el material adecuado para proporcionar una respuesta en combinación con el tejido fresco de papa para la cuantificación de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Se comprobó que el alambre por sí solo no respondiera al analito en estudio.

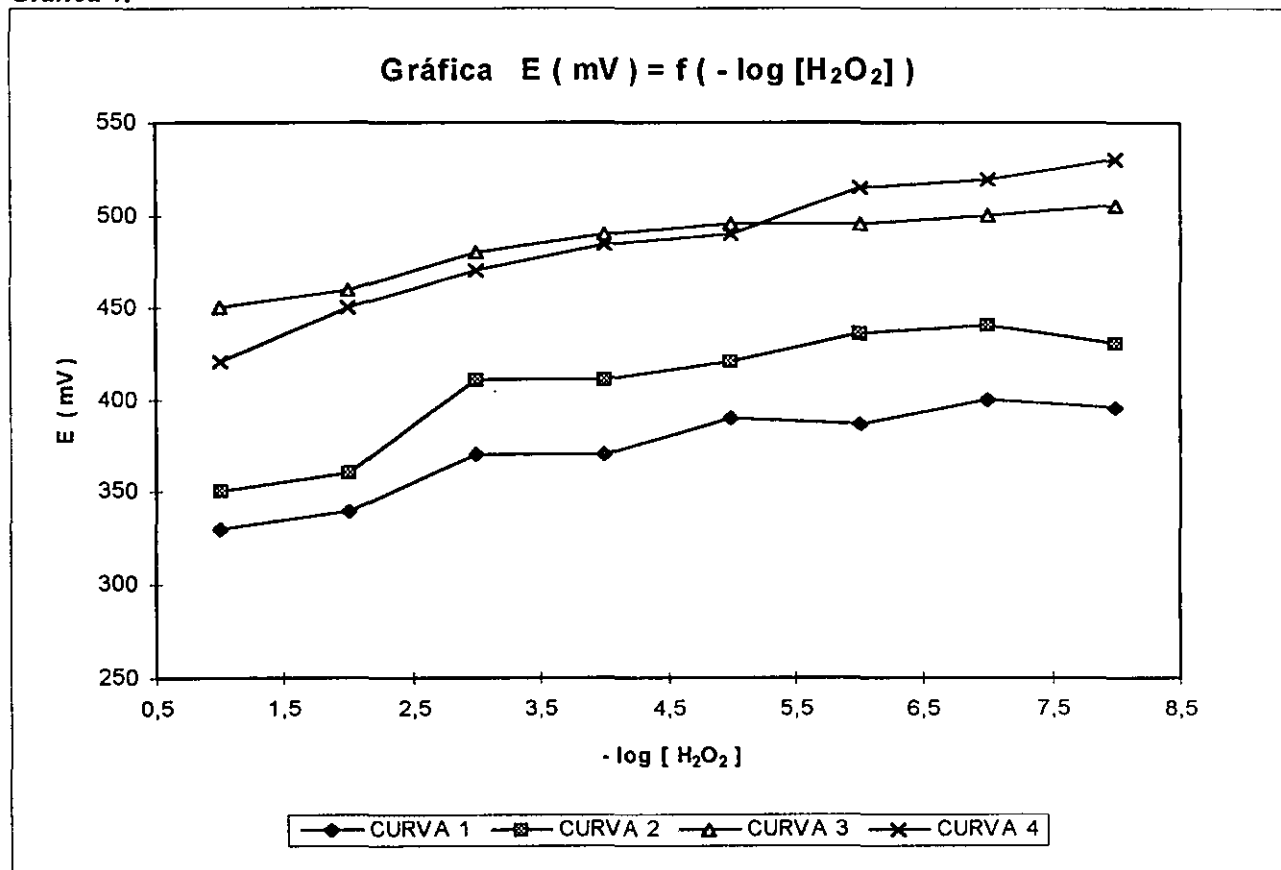
Los resultados obtenidos mediante el biosensor elaborado con tejido fresco de papa para cuatro curvas patrón se muestran a continuación:

Resultados experimentales  
Biosensor con tejido fresco de papa.

| $-\log[\text{H}_2\text{O}_2]$ | Curva patrón 1<br>E(mV) | Curva patrón 2<br>E(mV) | Curva patrón 3<br>E(mV) | Curva patrón 4<br>E(mV) |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 1                             | 330                     | 350                     | 450                     | 420                     |
| 2                             | 340                     | 360                     | 460                     | 450                     |
| 3                             | 370                     | 410                     | 480                     | 470                     |
| 4                             | 370                     | 410                     | 490                     | 485                     |
| 5                             | 390                     | 420                     | 495                     | 490                     |
| 6                             | 386                     | 435                     | 495                     | 515                     |
| 7                             | 400                     | 440                     | 500                     | 520                     |
| 8                             | 395                     | 430                     | 505                     | 530                     |
| P1                            | 410                     | 445                     | 545                     | 525                     |
| P2                            | 400                     | 460                     | 535                     | 515                     |

La correspondiente gráfica de  $E \text{ (mV)} = f(-\log[\text{H}_2\text{O}_2])$  en donde se describen las curvas anteriores se presentan a continuación; (*gráfica 1*).

Gráfica 1.



Se muestran las respectivas curvas de Nikolsky:

| Curva patrón | b       | m       | $r^2$  |
|--------------|---------|---------|--------|
| 1            | 312.73  | 14.82   | 0.9890 |
| 2            | 328.26  | 18.78   | 0.9767 |
| 3            | 435.30  | 13.82   | 0.9781 |
| 4            | 402.998 | 21.2157 | 0.9729 |



Resultados experimentales  
Biosensor con tejido fresco de papa.

En seguida se comparan las concentraciones obtenidas mediante el biosensor de papa y las obtenidas mediante volumetría usando permanganato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ ), de acuerdo a la ecuación de tendencia :

Para P1:

| Curva de calibración | $-\log [\text{H}_2\text{O}_2]\text{P1}$<br>biosensor | $[\text{H}_2\text{O}_2]\text{P1}$<br>biosensor | $[\text{H}_2\text{O}_2]\text{P1}$<br>Volumetría | % error |
|----------------------|--|--|---|---------|
| 1                    | 6.5620   | $2.74 \cdot 10^{-7}$                           | 0.055   | >> 100  |
| 2                    | 6.2133   | $6.11 \cdot 10^{-7}$                           | 0.055   | >> 100  |
| 3                    | 7.9350   | $1.16 \cdot 10^{-8}$                           | 0.055   | >> 100  |
| 4                    | 5.7505   | $1.77 \cdot 10^{-6}$                           | 0.055   | >> 100  |

\*donde  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  se expresa en Molaridad

Para P2:

| Curva de calibración | $-\log [\text{H}_2\text{O}_2] \text{P2}$<br>biosensor | $[\text{H}_2\text{O}_2]\text{P2}$<br>biosensor | $[\text{H}_2\text{O}_2]\text{P2}$<br>Volumetría | % error |
|----------------------|---|--|---|---------|
| 1                    | 6.0213  | $6.11 \cdot 10^{-07}$                          | 0.275   | >> 100  |
| 2                    | 7.0123  | $9.72 \cdot 10^{-8}$                           | 0.275   | >> 100  |
| 3                    | 7.2116  | $6.14 \cdot 10^{-8}$                           | 0.275   | >> 100  |
| 4                    | 5.2701  | $5.36 \cdot 10^{-5}$                           | 0.275   | >> 100  |

\*donde  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  se expresa en Molaridad

Las gráficas correspondientes a las curvas de calibración muestran que es posible tener un valor de potencial de acuerdo con la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sin embargo, al comparar las concentraciones de los problemas obtenidas mediante el biosensor con tejido fresco de papa, contra las determinadas por valoración con permanganato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ ) se observa un %error grande en extremo.

Se consideró entonces que la degradación del tejido, impide al biosensor responder de la misma manera en cierto tiempo. Dado lo anterior, se efectuó otro experimento para trazar de nuevo una curva de calibración en el cual se cuidó mucho que el grosor del tejido fuera constante y además éste fue sustituido para cada determinación individual de las soluciones problema y estándar.

Interpolando el potencial promedio obtenido de las muestras problema en la curva de calibración se determinó que sus concentraciones eran:

| Muestra problema | $[\text{H}_2\text{O}_2]$ Molar<br>volumetría | $[\text{H}_2\text{O}_2]$ Molar<br>biosensor | %error<br>% error |
|------------------|--|---|-------------------|
| 1                | $8.396 \cdot 10^{-3}$                        | $6.309 \cdot 10^{-2}$                       | >> 100            |
| 2                | $2.559 \cdot 10^{-5}$                        | $1.778 \cdot 10^{-2}$                       | >> 100            |
| 3                | $6.048 \cdot 10^{-5}$                        | $2.238 \cdot 10^{-4}$                       | >> 100            |

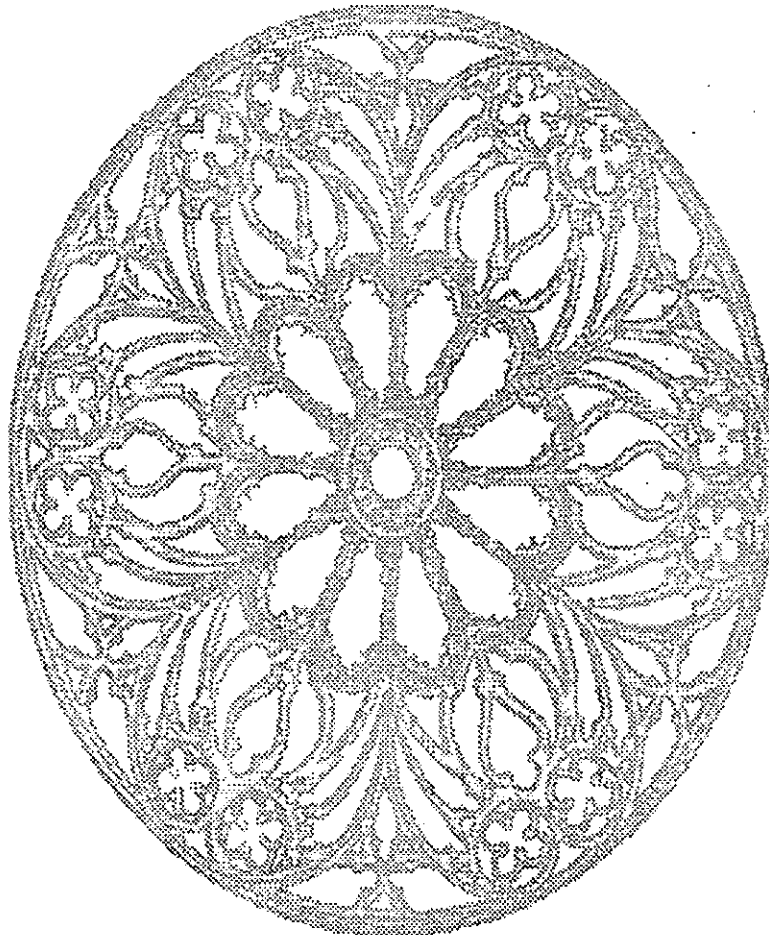
Siendo el porcentaje de error no mejoró, se realizaron cuatro ensayos más, utilizando el método de adiciones estándar para investigar la concentración de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en las soluciones de prueba.

Resultados experimentales  
Biosensor con tejido fresco de papa.

Los resultados obtenidos fueron:

| Curva de calibración | [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] Molar biosensor | [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] Molar volumetría | %error |
|----------------------|--|---|--------|
| 1                    | $1.00 \cdot 10^{-8}$                             | $1.125 \cdot 10^{-4}$                             | >> 100 |
| 2                    | $5.50 \cdot 10^{-29}$                            | $6.275 \cdot 10^{-5}$                             | >> 100 |
| 3                    | $2.28 \cdot 10^{-5}$                             | $6.275 \cdot 10^{-5}$                             | 63     |
| 4                    | $6.01 \cdot 10^{-7}$                             | $6.275 \cdot 10^{-5}$                             | >> 100 |

En ésta tabla puede apreciarse aún resultados con una precisión y exactitud pobre aún, por lo que se pensó que la concentración del enzima empleada en el trocito de papa empleado era lo suficientemente pequeña para su pronta inactivación. Este fue el fundamento del uso de un extracto acuoso de papa cruda para montar el biosensor selectivo al analito de interés.



6.2. Biosensor con extracto acuoso de papa cruda.

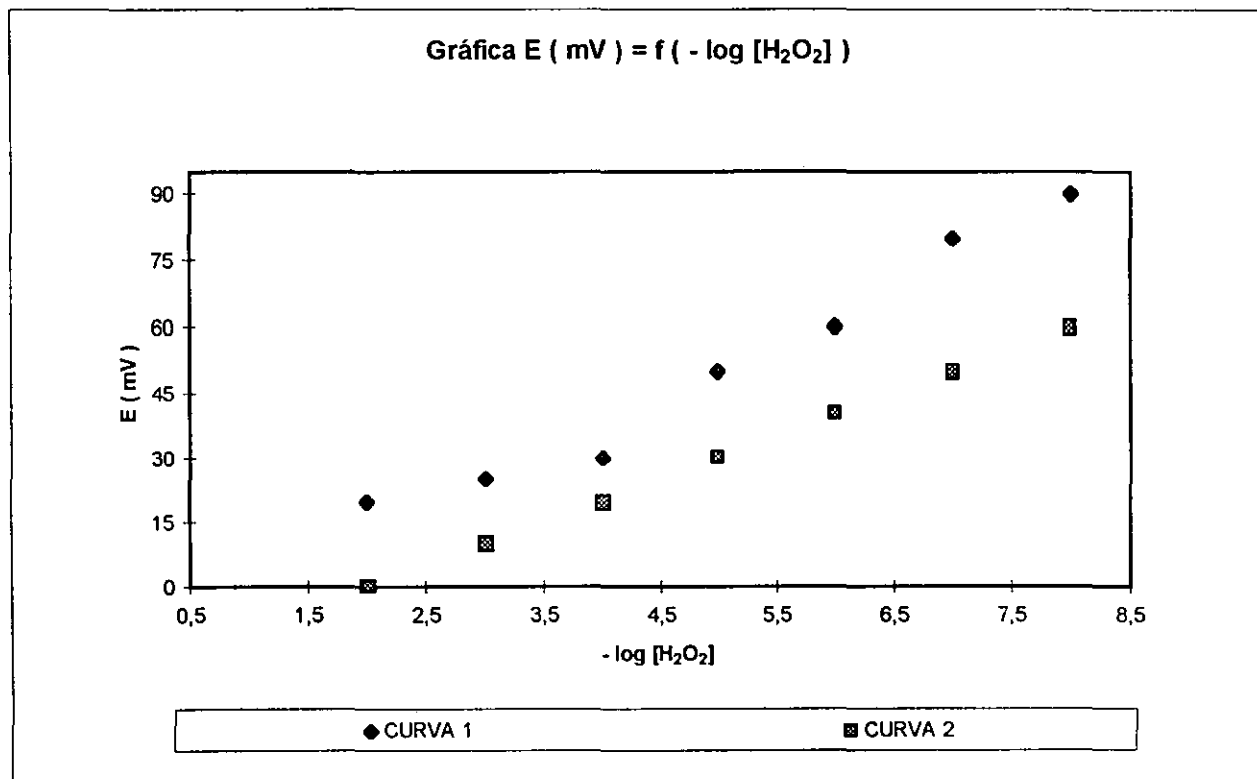
Realizando el mismo protocolo para la preparación de muestras, estándares y determinación del potencial, los resultados fueron los siguientes:

| - log [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] | Curva patrón 1<br>E(mV) | Curva patrón 2<br>E(mV) |
|--|-------------------------|-------------------------|
| 2                                      | 20                      | 0                       |
| 3                                      | 25                      | 10                      |
| 4                                      | 30                      | 20                      |
| 5                                      | 50                      | 30                      |
| 6                                      | 60                      | 40                      |
| 7                                      | 80                      | 55                      |
| 8                                      | 90                      | 60                      |
| Problema                               | 40                      | 20                      |

Nota: Es importante hacer notar que las curvas de calibración 1 y 2 se efectuaron usando el mismo extracto de papa. Sin embargo, en la curva se empleó el extracto concentrado, mientras que en la curva 2 el extracto se diluyó una 1:3.

Las curvas de calibración registradas se muestran en la *gráfica 2*:

Gráfica 2.



Resultados experimentales  
Biosensor con extracto acuoso de papa cruda.

---

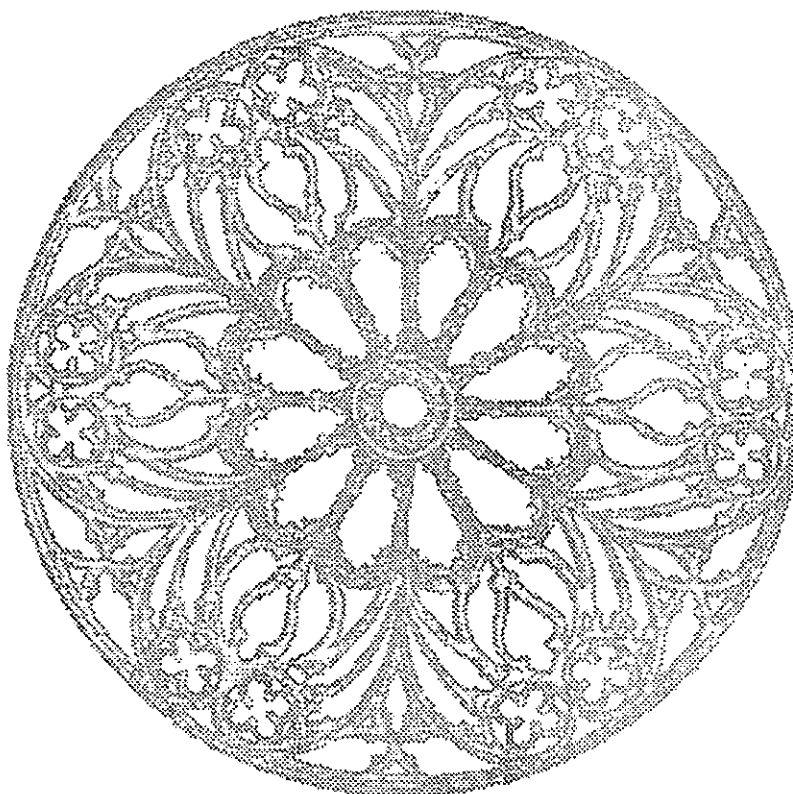
Las ecuaciones respectivas de Nicolsky son:

| Curva patrón | b       | m      | $r^2$  |
|--------------|---------|--------|--------|
| 1            | -11.786 | 12.5   | 0.9676 |
| 2            | -21.071 | 10.357 | 0.9941 |

De los resultados puede verse claramente que el extracto acuoso de papa cruda en el biosensor arroja una respuesta proporcional a la concentración de los estándares, lo que es buen indicio para darle uso en el análisis de muestras de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

Interpolando las magnitudes de potencial para la muestra problema en ambas curvas de calibración 1 y 2 se obtiene la misma concentración de la muestra problema para ambas que es de  $1.2 \cdot 10^{-4}$  Molar. La concentración de ésta misma solución obtenida mediante volumetría es de  $5.6 \cdot 10^{-4}$  Molar. El porcentaje de error calculado para éstos experimentos es de 78%.

Dado que el porcentaje de error decreció al usar el extracto acuoso, el siguiente experimento que se planteó fue el montar el biosensor pero esta vez con el biocomponente puro: catalasa comercial de origen bovino.



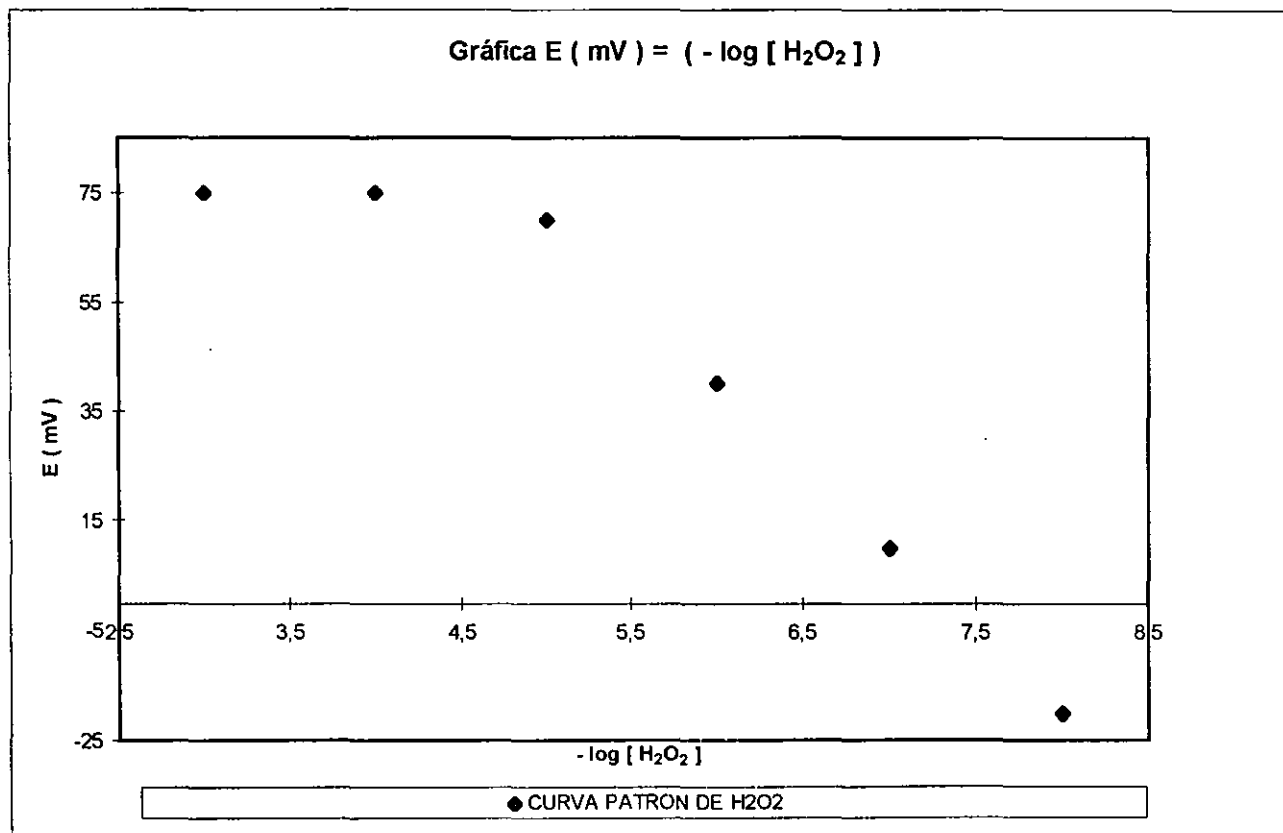
### 6.3. Biosensor con catalasa pura comercial.

Con el mismo protocolo, los resultados fueron:

| $-\log [H_2O_2]$ | Curva patrón 1<br>E(mV) |
|------------------|-------------------------|
| 1                | 60                      |
| 2                | 80                      |
| 3                | 75                      |
| 4                | 75                      |
| 5                | 70                      |
| 6                | 40                      |
| 7                | 10                      |
| 8                | -20                     |
| Problema         | 45                      |

La gráfica correspondiente se ilustra a continuación; (*gráfica 3*):

**Gráfica 3.**



Resultados experimentales  
Biosensor con extracto acuoso de papa cruda.

---

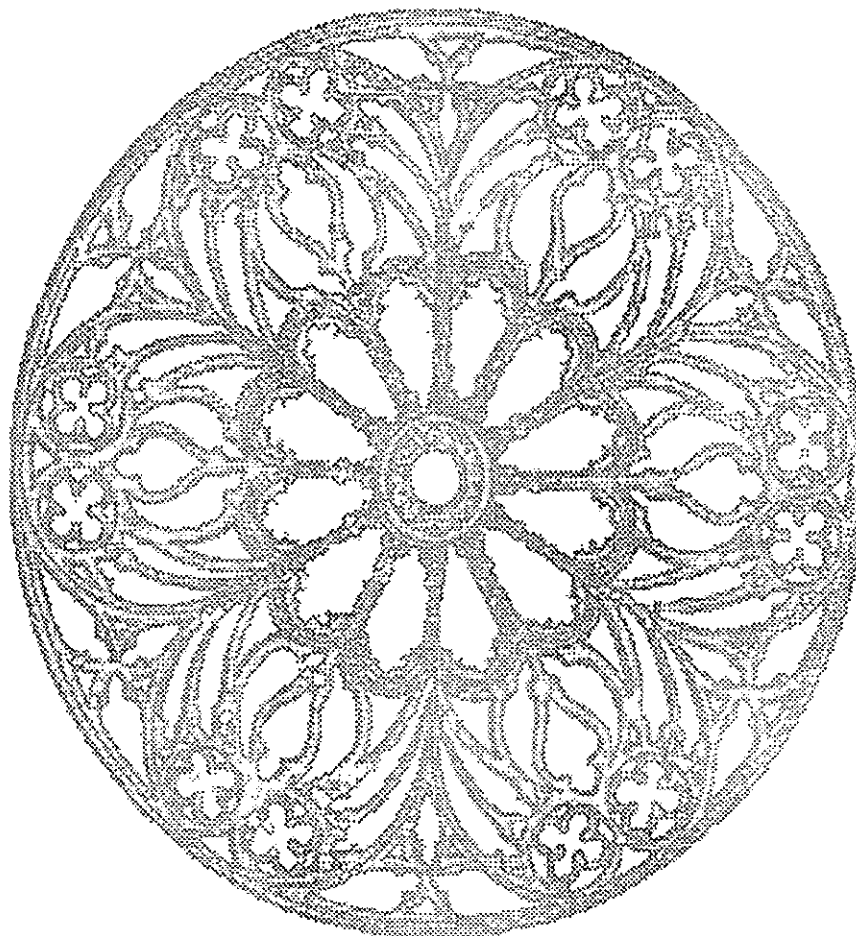
Ecuación de Nicolsky:

$$b = 185 \quad m = -25 \quad r^2 = 0.9615$$

En éste caso la concentración obtenida para el problema con el biosensor, comparada con el dato volumétrico arroja en forma reproducible, un porcentaje de error que mejora el obtenido en el experimento del biosensor con extracto acuoso de papa cruda.

| [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] Molar biosensor | [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] Molar volumetría | %error |
|--|---|--------|
| 4*10 <sup>-6</sup>                               | 2.5*10 <sup>-6</sup>                              | 60     |

Obtenidas las mejoras anteriores en el desarrollo del biosensor, antes de acrecentar su precisión y exactitud, se buscó la forma de miniaturizarlo. Así se construyó el primer prototipo en el que el biosensor no tendría que sumergirse en la muestra, sino más bien llevar la muestra al biosensor para la determinación que nos ocupa; es decir, se diseñó una microcámara con el sistema potenciométrico integrado.



#### 6.4. Biosensor combinado selectivo a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), miniaturizado.

##### 6.4.1. Primer prototipo miniaturizado.

Una vez montado el biosensor combinado, se averiguó la posibilidad de obtener una curva de calibración de acuerdo a las soluciones stock empleadas y sus correspondientes potenciales. Se observó entonces que la respuesta era diferente con respecto a los electrodos anteriores, ya que el potencial variaba con el tiempo teniéndose en un principio un rápido incremento seguido de un decremento y finalmente la magnitud del potencial era casi idéntica para todas las soluciones estándar.

Debido a lo anterior y antes de continuar con los ensayos, se determinó :

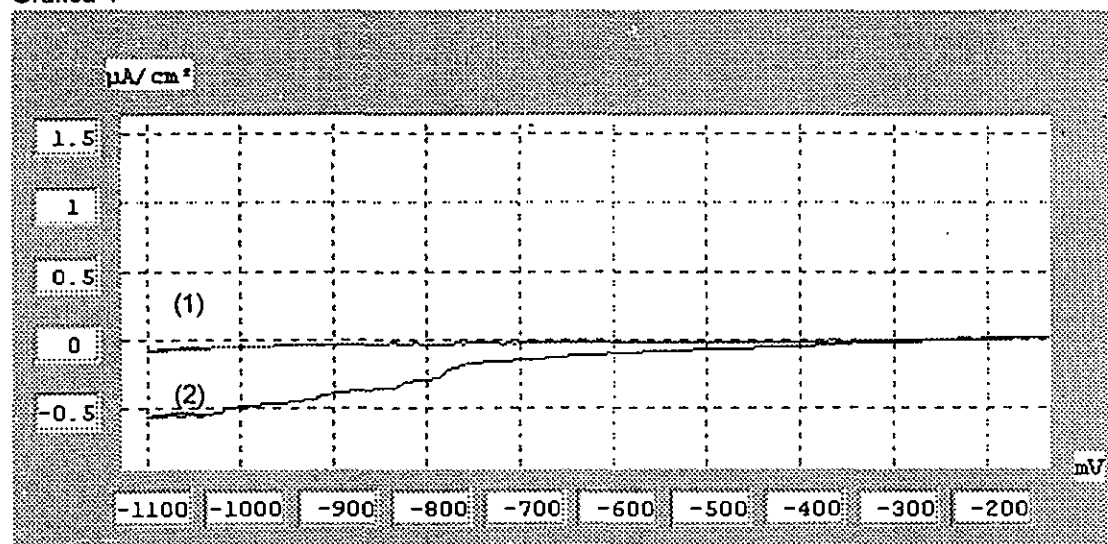
primero: si la diferencia de potencial observada correspondía efectivamente a la reducción del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

segundo: si al pequeño volumen de nuestra solución en el electrodo de trabajo la enzima catalasa mostraba una actividad funcional.

tercero : si existía la posibilidad de efectuar la determinación del potencial en algún tiempo específico, correlacionando los resultados con la concentración de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

Se efectuó entonces un voltamperograma para la determinación experimental del potencial de reducción del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el cual resultó ser de  $-800$  mV. Se usó como blanco para este experimento la solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.4 que hasta entonces se ha usado en la preparación de los diferentes estándares. La gráfica obtenida se muestra a continuación (Gráfica 4a):

Gráfica 4ª



\* Determinación del potencial de reducción para peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

(1) Dominio de electroactividad. Solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.4.

(2) Electroreducción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Solución ( $H_2O_2$ ) 0.01 M

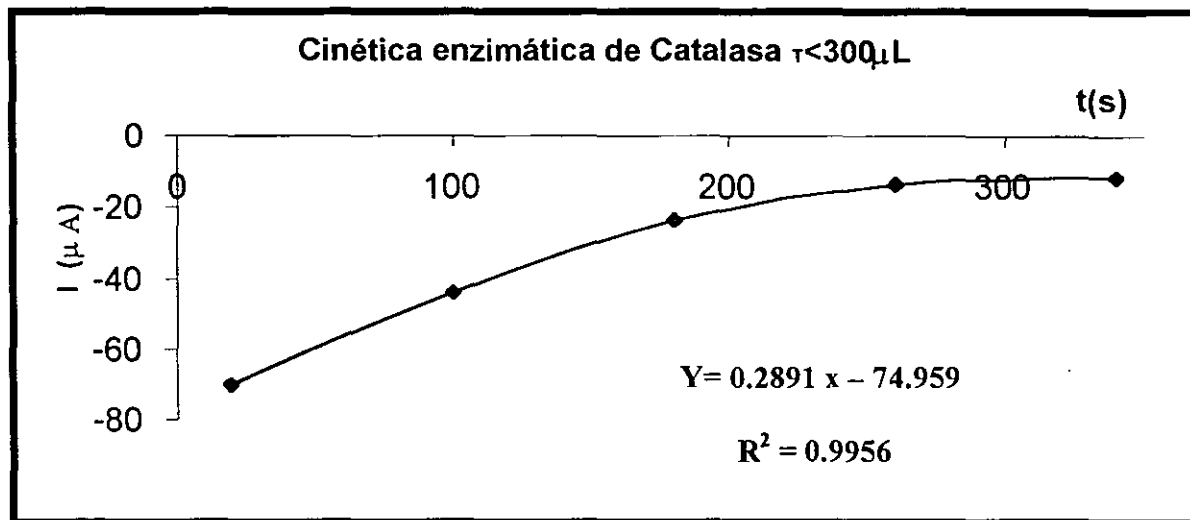
$E_t = C^\circ$ ,  $E_{ref} = Cu^0/Cu^{2+}$ ,  $E_{aux} =$  Acero inoxidable.

Posteriormente se consiguió con ayuda del software comercial "Voltmaster", el siguiente cronoamperograma, en el cual el potencial se fijó en  $-800$  mV para asegurar que la variación de la

Resultados experimentales  
 Biosensor combinado selectivo a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), miniaturizado

corriente registrada se debiera unicamente a la reducción enzimática del analito. Lo anterior describió una actividad funcional de la catalasa (Gráfica 4b).

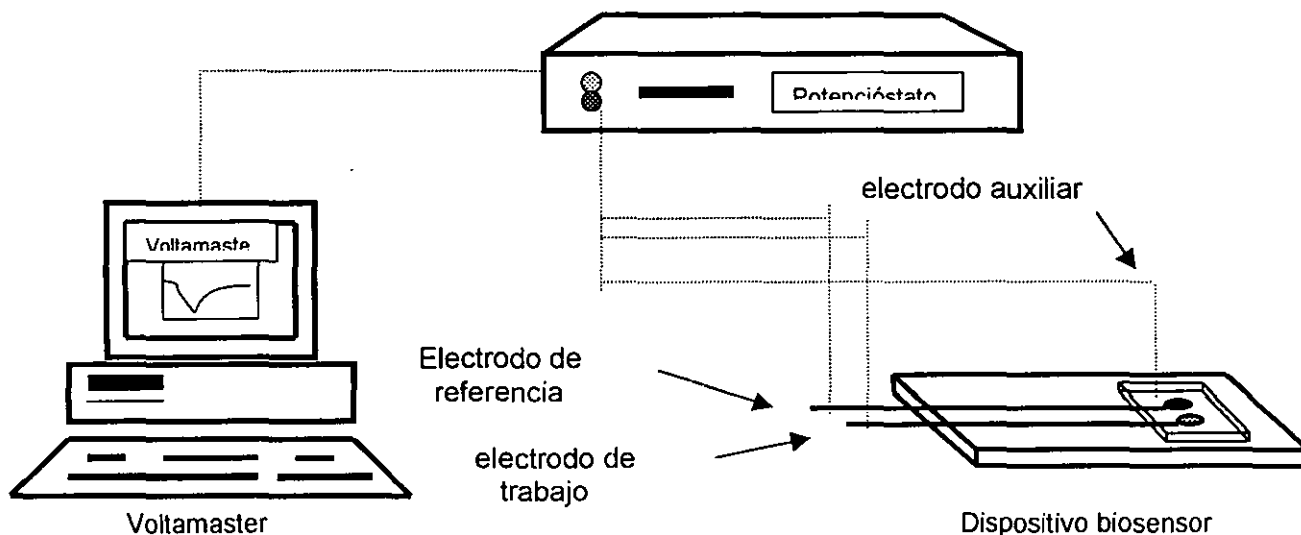
Gráfica 4b.



\* Cronoamperograma  $E = -800 mV$ ,  $t$  (muestreo) = 20 s.  $t$  (total de muestreo) = 340 s.  
 Ecuación lineal:  $Y = 0.2891 X - 79.959$ ;  $R = 0.9956$   
 Concentración de la enzima catalasa:  $4.2 \mu g/mL$   
 $E_t = C^0$ ;  $E_{ref} = Cu^0 / Cu^{2+}$ ;  $E_{aux}$ : acero inoxidable.

Finalmente se observó el potencial libre en función del tiempo para cada una de las soluciones stock a fin de determinar: primero, si la variación observada correspondía a la inestabilidad de un potencial impuesto por el electrodo de referencia empleado (para ello se empleó una solución blanco de buffer amortiguadora de fosfatos a pH de 7, 20mM) y segundo, de resultar negativa la primera premisa, si era factible realizar la lectura del potencial a un tiempo tal que permitiera continuar el diseño experimental como hasta ahora se había realizado. Para estos fines se empleó el software comercial "Voltmaster", con el que se describieron las gráficas de potencial en función del tiempo:  $E(mV) = f(t, seg)$ ; (figura L).

- *Figura L.* Determinación del potencial libre en función del tiempo y de la corriente en función del tiempo a potencial impuesto usando el software comercial "Voltmaster"

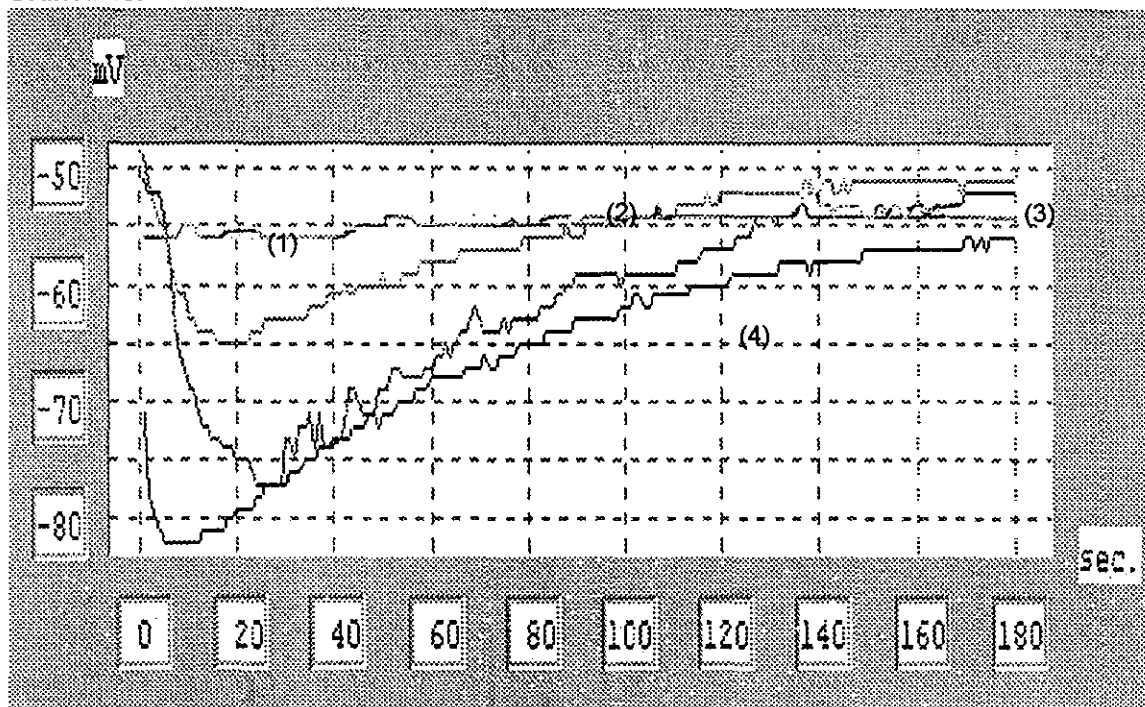




Resultados experimentales  
 Biosensor combinado selectivo a peróxido de hidrógeno (  $H_2O_2$  ), miniaturizado

La determinación del potencial libre se realizó cada segundo durante tres minutos. Se obtuvo entonces la siguiente gráfica; (*gráfica 4*) :

Gráfica 4c.



\*\* Las curvas de arriba hacia abajo corresponden a las siguientes soluciones:

- (1) Blanco (amortiguador de fosfatos a pH 7, 20 mM)
- (2) Solución estándar de  $[H_2O_2]$  igual a  $10^{-1}$  M
- (3) Solución estándar de  $[H_2O_2]$  igual a  $10^{-7}$  M
- (4) Solución estándar de  $[H_2O_2]$  igual a  $10^{-8}$  M

De acuerdo con la curva obtenida para el blanco (solución amortiguadora de fosfatos a pH 7, 20 mM) puede apreciarse que no hay variaciones significativas del potencial libre con respecto al tiempo, esto significa que el fenómeno observado no se encuentra en función del electrodo de referencia. Con lo que respecta a las curvas para las soluciones stock la variación del potencial con el tiempo es visible apreciándose que todas poseen picos distintos (el origen muy probablemente se deba a la cinética de la catalasa en el sistema biosensor). Finalmente con base a la gráfica se eligió el tiempo de treinta segundos para realizar las lecturas de potencial para el diseño experimental propuesto en un inicio.

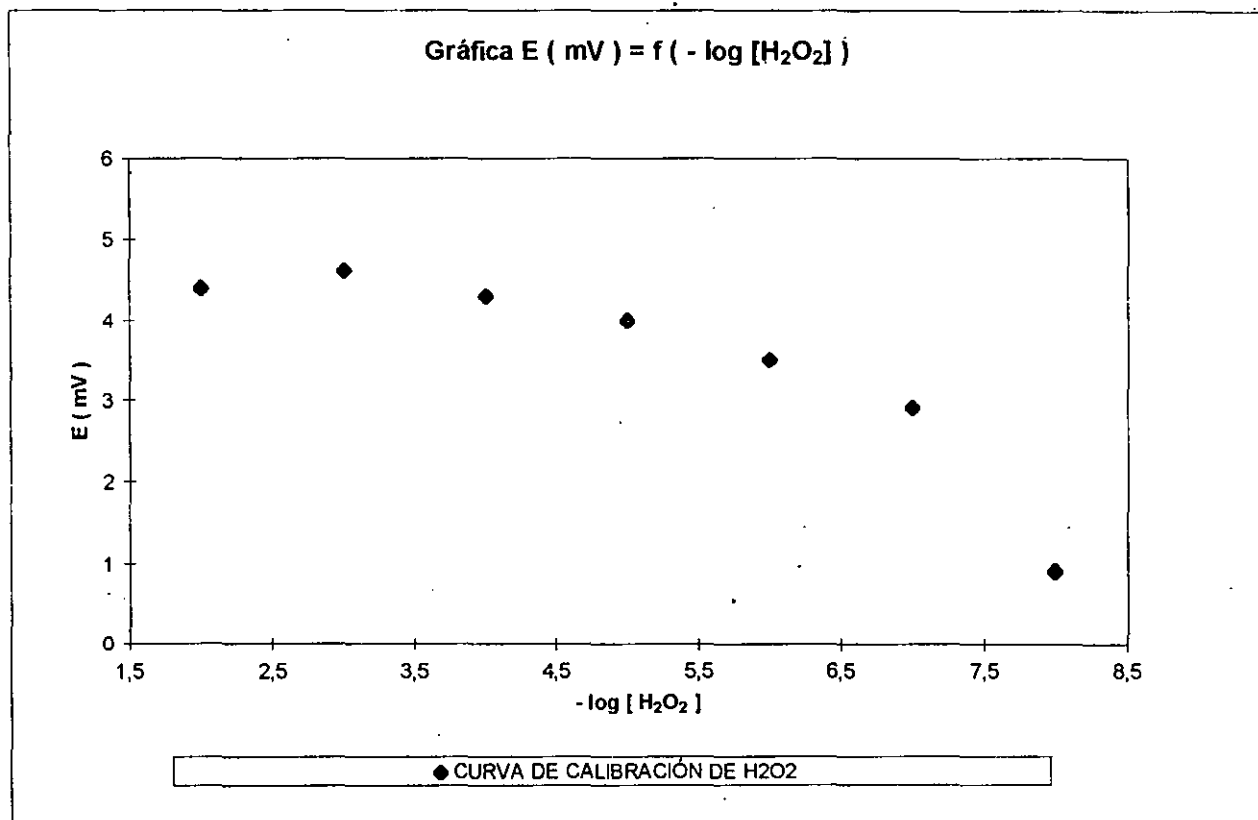
Los resultados generados fueron:

| $-\log [H_2O_2]$ | Curva patrón<br>E (mV) |
|------------------|------------------------|
| 1                | 3.0                    |
| 2                | 4.4                    |
| 3                | 4.6                    |
| 4                | 4.3                    |
| 5                | 4.0                    |
| 6                | 3.5                    |
| 7                | 2.9                    |
| 8                | 0.9                    |

\* cada lectura se tomó a 30 segundos después de adicionar la muestra en la unidad de determinación para peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

La curva anterior se describe gráficamente a continuación (*gráfica 5*):

**Gráfica 5.**



Ecuación de Nicolsky:

$$b = 5.3771 \quad m = 0.3171 \quad r^2 = 0.8565$$

Los resultados obtenidos para el caso de muestras problemas utilizando la unidad de determinación respectiva son:

| [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] Molar biosensor | [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] Molar Volumetría | %error |
|--|---|--------|
| 5.68*10 <sup>-3</sup>                            | 10 <sup>-3</sup>                                  | 43%    |
| 6.08*10 <sup>-6</sup>                            | 10 <sup>-7</sup>                                  | 39.2%  |

Esta gráfica demuestra que con este primer prototipo miniaturizado, todavía es posible describir una curva de calibración como las anteriormente trazadas. En tanto que el porcentaje de error para estos ensayos muestra cierta disminución con respecto al biosensor hecho con catalasa pura.

Por otra parte, el volumen mínimo de muestra que puede ser depositado en la unidad de análisis (considerando las dimensiones del pozo creado para contener la solución, 1cm (ancho)\*1.5 cm (largo)\*0.2cm (profundidad)= 0.3cm<sup>3</sup>), es de 300  $\mu$ L, sin embargo, bien puede aplicarse la mitad de éste volumen para obtener los mismos resultados. Dado que se esperaba utilizar una cantidad de muestra mucho menor, se diseñó un segundo prototipo para este fin.

#### 6.4.2. Segundo prototipo miniaturizado.

Al montar esta unidad de determinación se cuidó mucho en ajustar muy bien las dos placas de acrílico mediante los cuatro tornillos, pues de lo contrario se presentaban fugas hacia los lados del interior de la unidad tanto de la solución concentrada con enzima como de la muestra cuando se aplicaba sobre el pozo.

Con relación al volumen de muestra requerido, las dimensiones del lugar destinado a depositarlo corresponden a 64 $\mu$ L (0.4cm (ancho)\*0.8cm (largo)\*0.2cm (profundidad)= 0.064cm<sup>3</sup>), con lo que se reduce a más de la mitad el requerimiento del primer prototipo de la unidad de análisis el analito que nos ocupa.

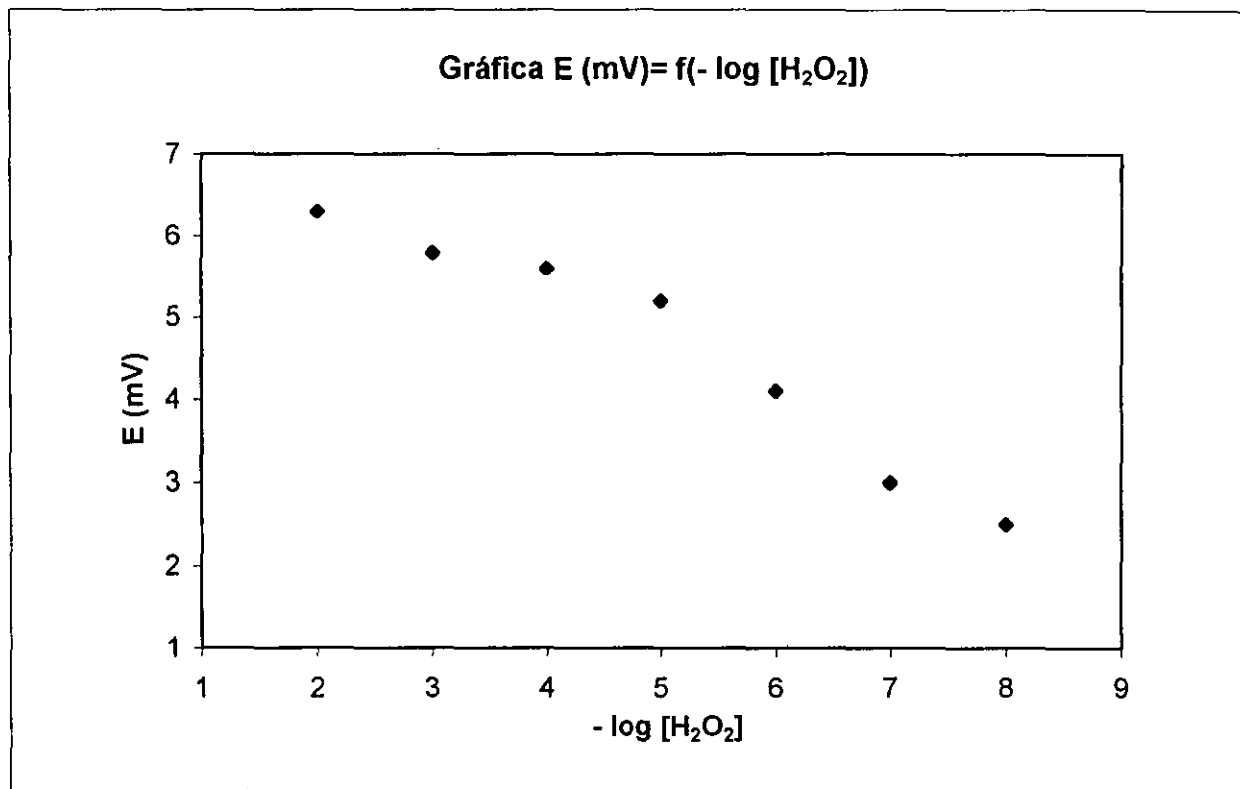
Se probó la unidad con las soluciones stock para trazar la curva de calibración correspondiente, los resultados fueron:

| - log [ $H_2O_2$ ] | Curva patrón<br>E (mV) |
|--------------------|------------------------|
| 1                  | 8.2                    |
| 2                  | 6.3                    |
| 3                  | 5.8                    |
| 4                  | 5.6                    |
| 5                  | 5.2                    |
| 6                  | 4.1                    |
| 7                  | 3.0                    |
| 8                  | 2.5                    |

\* cada lectura se tomó a 30 segundos después de adicionar la muestra sobre la unidad de determinación para peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

La respectiva gráfica a ésta curva patrón es; (**gráfica 6**) :

Gráfica 6.



Ecuación de Nicolsky:

$$b= 8.4036 \quad m=1.7369 \quad r^2= 0.9515$$

Es importante aclarar que para esta unidad biosensora volvió a presentarse el fenómeno de la variación del potencial con respecto al tiempo de manera similar al observado para el primer prototipo, por lo que se decidió de nuevo realizar las lecturas de potencial a un tiempo de treinta segundos.

Los resultados generados en relación con muestras problema y la comparación de sus concentraciones determinadas mediante el bioelectrodo combinado miniaturizado y las obtenidas por medio de volumetría muestran una similitud con los resultados arrojados por el primer prototipo:

| [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] Molar biosensor | [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] Molar volumetría | %error |
|--|---|--------|
| 1*10-6   | 1*10-6  | 40%    |
| 2.5*10-6   | 4*10-6  | 37%    |

De la gráfica anterior se observa de nuevo la posibilidad de trazar una curva patrón. La diferencia de potencial de un estándar a otro es mayor en éstos ensayos a comparación al primer

prototipo, muy probablemente porque la membrana de diálisis se adhiere más a la placa de acrílico en el segundo prototipo y la muestra entra en contacto más fácilmente con los electrodos de la

unidad. Por esta razón se planea la construcción de un tercer prototipo en el que la membrana cubra únicamente el electrodo de trabajo (biosensor), buscando así que la respuesta del electrodo combinado mejore en cuanto a tiempo de respuesta y diferencia de potencial.

### 6.4.3. Tercer Prototipo miniaturizado.

Para la fabricación del tercer prototipo, en un principio se cubrió únicamente el electrodo de referencia con la membrana de diálisis entre las dos placas acrílicas, dado que se presentaban fugas, se selló entonces la membrana alrededor del electrodo con silicón. No obstante, después de un tiempo de uso de la unidad de análisis, se presentaba el desprendimiento de la membrana, volviendo a tener fugas de la solución de enzima e introduciéndose la muestra entre las placas de acrílico. Se resolvió finalmente el problema usando un cuadro de hule de manguera transparente, el cual además de fijar perfectamente la membrana, tiene una perfecta adhesión al acrílico al momento de ajustar la unidad de determinación con los tornillos.

El volumen final obtenido para éste último prototipo fue de  $32\mu\text{L}$ . Para el cálculo de éste volumen no solo se consideraron las dimensiones del pocito creado para contener la muestra ( $0.2\text{cm}$  (ancho) $\times 0.4\text{cm}$  (largo) $\times 0.2\text{cm}$  (profundidad)) =  $0.016\text{cm}^3 = 16\mu\text{L}$ , sino también las respectivas a los orificios que se hicieron en el cuadro de manguera así como su espesor ( $2 * [\pi * 0.1\text{cm}^2] * 0.1\text{cm} = 0.003\text{cm}^3 = 3\mu\text{L}$  (volumen de los orificios =  $2 * \text{área} * \text{espesor del hule}$ )); se obtiene así un volumen final de  $19\mu\text{L}$  ( $16\mu\text{L} + 3\mu\text{L} = 19\mu\text{L}$  (volumen final = volumen de los orificios + volumen del pozo para la muestra)).

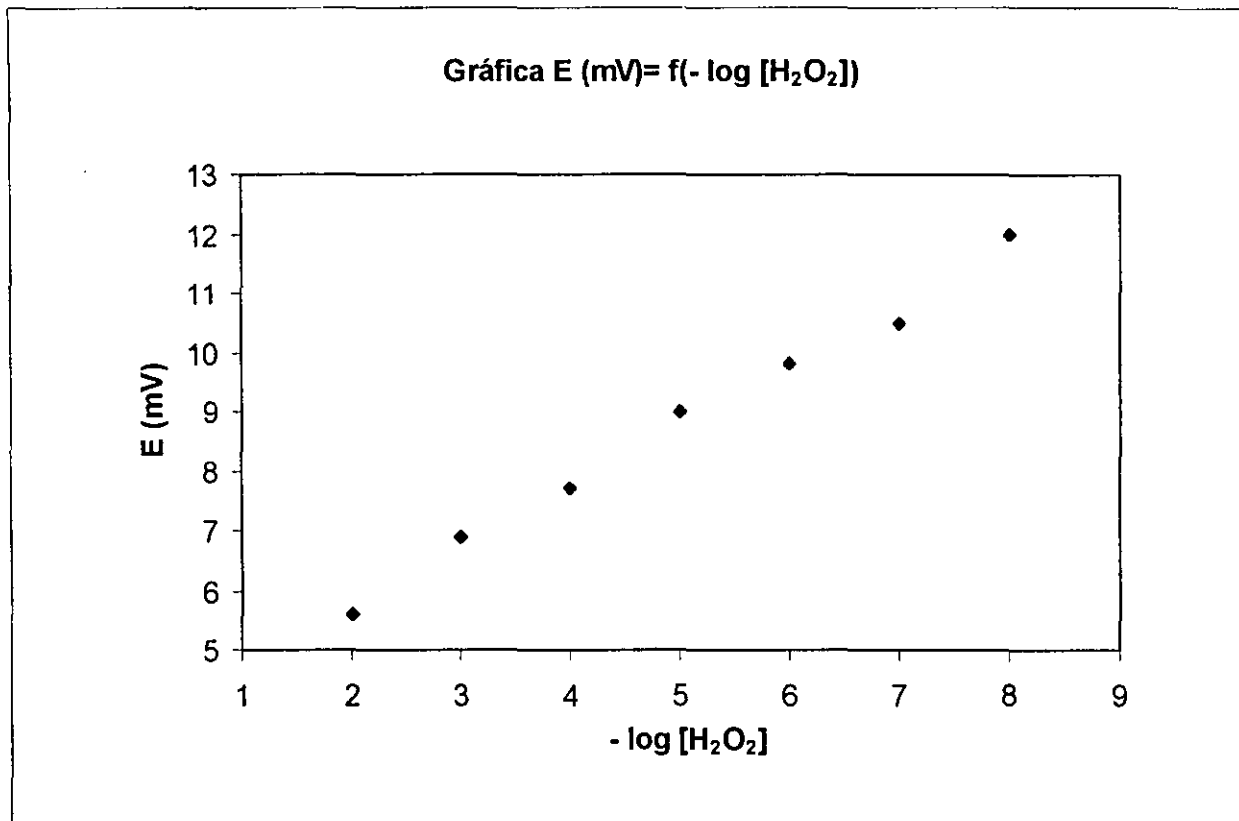
Siguiendo el mismo protocolo ya conocido, se probó la respuesta de la unidad de análisis con los siguientes resultados:

| - log [ $H_2O_2$ ] | Curva patrón<br>E (mV) |
|--------------------|------------------------|
| 2                  | 5.6                    |
| 3                  | 6.9                    |
| 4                  | 7.7                    |
| 5                  | 9.0                    |
| 6                  | 9.8                    |
| 7                  | 10.5                   |
| 8                  | 12.0                   |

\* cada lectura se tomó a 30 segundos después de adicionar la muestra sobre la unidad de determinación para peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

La gráfica que describe los datos anteriores se muestra a continuación; (*gráfica 7*):

Gráfica 7.



Ecuación de Nicolsky:

$$b = 3.6964 \quad m = 1.0179 \quad r^2 = 0.9925$$

El fenómeno presentado para los dos prototipos anteriores relacionado al incremento y decremento del potencial en las determinaciones se presentó de nuevo para la tercera unidad biosensora miniaturizada. Debido a esto se decidió de nuevo tomar las lecturas en las determinaciones treinta segundos después de haber adicionado la muestra sobre el pozo. Por otra parte el porcentaje de error observado para el ensayo de muestras problemas muestra un ligero descenso considerando los anteriores resultados para los biosensores y prototipos realizados:

| [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] Molar<br>Biosensor | [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] Molar<br>volumetría | %error |
|---|--|--------|
| 1.33*10 <sup>-5</sup>                               | 1*10 <sup>-5</sup>                                   | 33%    |
| 7.7*10 <sup>-5</sup>                                | 1*10 <sup>-4</sup>                                   | 23%    |

Los resultados anteriores muestran que al contrario de lo previsto para este ensayo, la diferencia de potencial entre uno y otro estándar fué similar a los ensayos anteriores, al emplear el segundo prototipo.

*A veces siento.*

A veces siento que hay un imán en el cielo

y me hace levantar mi rostro

envuelto en mil ojos.

Veo gusanos de seda, abejas y hormigas que no

dejan de trabajar.

El quinqué se apaga, vamos a descansar,

un volcán está activo,

un perro olfatea la tierra, un hueso lo hace escarbar,

una mujer maltratada a punto de estallar.

¡Libertad!, grita un preso, una oportunidad.

Quiero Justicia Señores,

Quiero Justicia y Libertad.

Mil guerreros vi pasar danzando,

Con tanta furia que sus pies la tierra acariciaba.

Y alas en sus pies tenían,

danza mágica y melodiosa

dedicada a las fuerzas del Universo,

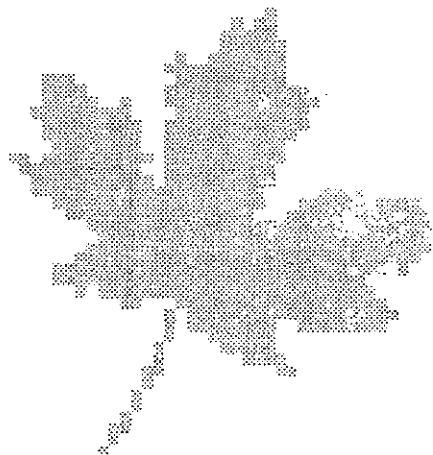
Copal y Teponahтли.

Aroma de Libertad, ya llega,

ya está aquí

El Señor Quetzalcoatl.

*Tío Alejandro.*



## 7. Análisis de resultados

---

Los datos obtenidos para el biosensor con tejido fresco de papa sugieren que la determinación de la concentración de una muestra de peróxido de hidrógeno [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] es para éste caso muy imprecisa e inexacta. Aunque es posible la descripción de curvas patrón utilizando los potenciales correspondientes a las soluciones stock, los porcentajes de error obtenidos para los ensayos sobrepasan por mucho el cien por ciento.

En un principio la descripción de curvas de calibración mediante el primer biosensor elaborado fue problemático debido a que la cantidad de enzima en el tejido sufría una degradación muy pronta después de las primeras cinco determinaciones. Para un mismo trozo de papa se intentó resolver dicho problema renovando la superficie del tejido que tenía contacto con la solución, obteniéndose de nuevo una variación de potencial, sin embargo, éste no era constante para un estándar determinado, así que en el futuro se trabajó no solo con dimensiones constantes de tejido, sino con porciones previamente refrigeradas para completar de éste modo el trazo de la curva patrón y la determinación posterior del potencial de las soluciones problema.

En siguientes experimentos, para cada una de las soluciones "stock", se cambió el tejido del biosensor antes de la determinación. Se obtuvieron entonces resultados con dispersiones muy altas. Finalmente, se utilizó una misma ración de tejido para todo el análisis y se empleó el método de adiciones estándar para la determinación de la concentración de un problema, concluyéndose que el análisis presenta una exactitud y precisión aún muy pobres.

Para el biosensor con extracto acuoso de papa cruda y con catalasa pura comercial, se llegaron a resultados en el que el porcentaje de error disminuyó de manera considerable a 78% y 60% respectivamente. Las curvas patrón obtenidas para estos casos, conservaron en promedio, el intervalo de linealidad observado en las curvas para el biosensor con tejido fresco de papa. En vista de estas mejoras en la respuesta del bioelectrodo, se decidió antes de optimizarlo, miniaturizarlo de tal modo que la cantidad de muestra necesaria para su buen funcionamiento fuera mucho menor que el volumen que hasta ahora se había utilizado en los experimentos anteriores.

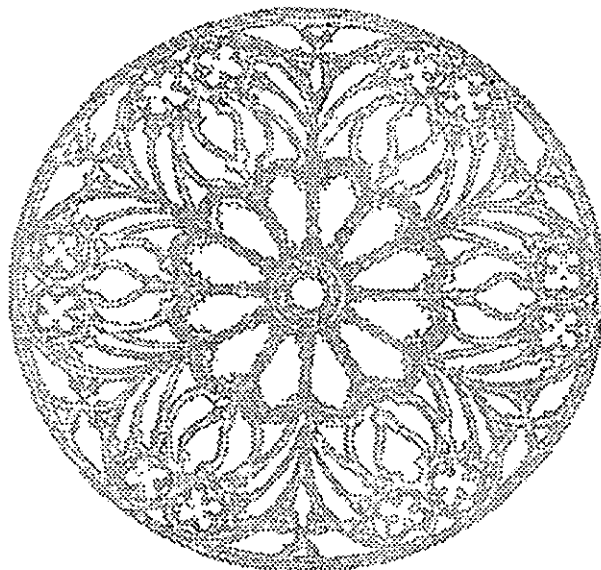


Refiriéndome ahora al desempeño de los prototipos empleados en la miniaturización del biosensor combinado, en las curvas patrón que se trazaron para tales ensayos, se observó una disminución en el intervalo de linealidad, ya que para las concentraciones  $10^{-1}$  y  $10^{-8}$ , los valores de potencial resultantes mostraron magnitudes que no fueron posibles de incluir dentro de las respectivas líneas de calibración. En cuanto al porcentaje de error mostrado por las unidades biosensoras respecto al método volumétrico los resultados muestran de un 23 a un 40% de error del sistema.

Comparando el tiempo de respuesta de los biosensores empleados y las cámaras miniaturizadas, para los primeros se tuvo una respuesta casi inmediata con potenciales estabilizados, mientras que, con base en los correspondientes cronopotenciogramas, las lecturas realizadas para los últimos se tomaron a treinta segundos después de haber dispensado la muestra sobre el pozo de la unidad de análisis. Con estos resultados se presume que el sustrato de la enzima agregado para la determinación es tan pequeño que su conversión es completa debido a la catálisis de la catalasa, es por esta razón que el valor de potencial para todos los estándares presenta una magnitud semejante al cabo de cierto periodo de tiempo. Esto es de particular interés ya que puede considerarse que la miniaturización del sistema altera las propiedades del mismo y por tanto su respuesta.

Con relación al volumen de muestra requerido en la determinación, para los prototipos primero, segundo y tercero, las cantidades empleadas fueron de  $300\mu\text{L}$ ,  $64\mu\text{L}$  y  $19\mu\text{L}$ . Al comparar el último volumen con los 9 mL que se usaron en las primeras determinaciones, se tiene una reducción de casi 500% en la cantidad de muestra requerida.

La disposición de las membranas de diálisis en los dispositivos miniaturizados es un factor importante en la optimización del análisis, siendo que para los prototipos dos y tres, en donde la membrana se encuentra más adherida a los electrodos, se distinguió un aumento similar entre uno y otro estándar comparado con los ensayos del prototipo uno.



Nombramos

para habitar

las cosas.

Hablamos

porque somos

hijos

del silencio.

Cada

Conjuro

Cada

gorjeo gemido

o nombre

anida

lo sagrado.

Solamente

palabra con sol

es humana

No

Nace

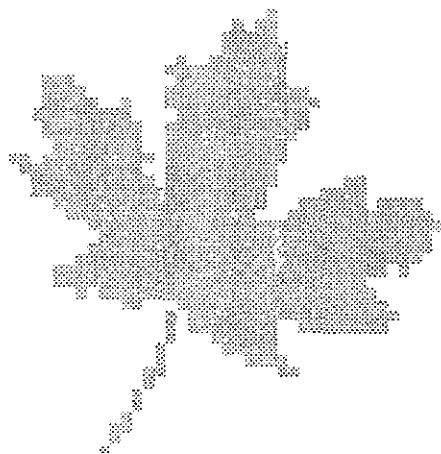
de la leña

No

engendra la ceniza

Basta un solo silbido de ave entre las ramas.

*Juan Bañuelos*



## 8. Conclusiones

---

De acuerdo a lo anterior, puede concluirse que:

El método potenciométrico (utilizando el biosensor combinado miniaturizado propuesto) para la determinación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es una buena alternativa al método volumétrico. Lo anterior se fundamenta en el hecho de que para todos los biosensores fabricados son posibles el trazo de curvas patrón. Aunque el porcentaje de error encontrado en la respuesta de algunos de los biosensores es grande, se comprobó que pequeñas modificaciones con respecto a la presentación en la cual se utiliza el biocomponente selectivo y la disposición de la membrana de diálisis en los dispositivos, mejora por mucho la respuesta del bioelectrodo. Se tiene entonces que el uso de la enzima pura de catalasa proporciona una vida media de uso mucho mayor (de varios días) que al usar únicamente tejido fresco de papa y extracto acuoso crudo de papa, sin embargo, aún con ambos se cuenta con una buena función en la determinación; además de que incrementa la confiabilidad de los datos obtenidos, ya que son más cercanos a la cuantificación obtenida por el método de referencia. El volumen final empleado de tan solo  $19 \mu L$  para el análisis, superó las expectativas en la miniaturización de la última unidad analítica armada, por tanto es factible un buen desempeño del biosensor combinado con la mínima cantidad de muestra.

La alternativa analítica para la cuantificación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) con respecto al método volumétrico ofrece múltiples ventajas como:

- especificidad, siendo que el biosensor desarrollado es realmente selectivo a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y su respuesta es proporcional a la concentración de estándares, lo que hace posible describir curvas de calibración y la cuantificación de muestras problema; dicha especificidad la proporciona el elemento biológico integrado en el electrodo (enzima catalasa).
- económico, pues aún utilizando enzima pura de catalasa, la pequeña cantidad que se utiliza de esta (3 mg) para la elaboración del electrodo de trabajo, junto con los materiales empleados para la elaboración de la unidad para la determinación analítica de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), son accesibles a cualquier laboratorio de análisis.

- de fácil montaje; nuestra unidad de determinación puede armarse sin problema en un máximo de quince minutos.
- medición rápida y simplicidad, debido a que la manipulación de la muestra es mínima, se evita cualquier pérdida del analito en estudio.
- uso mínimo de reactivos, lo que resulta en la generación de residuos contaminantes.
- uso del elemento biológico en forma repetida y reproducibilidad en los resultados, dado que puede usarse en varias determinaciones la misma pasta con enzima y además la reposición de ésta no implica cambios en el comportamiento del biosensor.
- determinaciones independientes al color de la muestra, siendo que la respuesta de nuestro biosensor es potenciométrica.
- Cantidad mínima de muestra requerida, ya que solo se necesitan 19 $\mu$ L para obtener la lectura correspondiente.

**No obstante, a lo anterior, los últimos prototipos poseen múltiples ventajas en comparación con otros electrodos enzimáticos:**

- No necesitan de un electrodo de referencia, dado que la unidad de determinación ya contiene uno.
- Mayor selectividad al peróxido de hidrógeno [ $H_2O_2$ ] que la que proporciona un electrodo basado en platino, puesto que el elemento selectivo empleado es la enzima catalasa y no el transductor.
- La posibilidad de integrar al dispositivo construido otros elementos selectivos a otros analitos para basar la determinación de los mismos en la detección de peróxido de hidrógeno [ $H_2O_2$ ] como señal de transducción.
- Una determinación que no comprometa un cambio en el pH y comprometa el desempeño mismo del enzima y del electrodo, tal como sucedería en el caso de HRP.
- Buen intervalo de linealidad, el cual supera a los encontrados dentro de la bibliografía consultada y es similar a los hallados comercialmente.
- Tiempo de respuesta casi inmediato, de treinta segundos, ya que la mayoría de los biosensores reportados presentan un tiempo de respuesta de hasta tres segundos; este factor es una gran ventaja dentro de la expectativa de la automatización.
- Posibilidad de empleo prolongado, siendo que el enzima pura preserva el funcionamiento del electrodo de uno a tres días.
- Fácil construcción, debido a que no implica tiempos de curado, electropolimerizaciones, adsorción de sustancias, entre otros



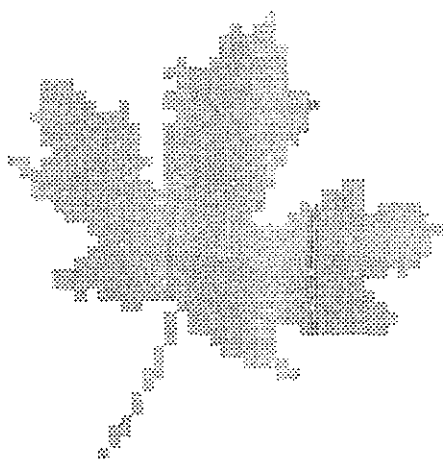
**“Reinaré en el honor y la gloria. No soy yo quien me alaba, es la Naturaleza, porque ella es mi madre y yo le obedezco todavía. Ella me conoce y yo la conozco. La luz que está en ella, yo la he contemplado, la he demostrado en el Microcosmos y la he vuelto a encontrar en el Universo.”**

*El Tesoro de los Tesoros de los Alquimistas.  
Paracelso.*

**“...Después de los Elementos espirituales, consideremos los cuerpos sacados de los Elementos exteriormente de una naturaleza corporal e interiormente de una naturaleza espiritual; porque los cuerpos no son sino las prisiones que encierran a los espíritus interiores y activos para limitarlos; están limitados de vida y de muerte; cuntos más órganos tienen, son tanto más corruptibles, sólo la unidad es inmortal, porque la composición presupone la separación...”**

**...No basta conocer la armonía de las cosas terrestres esenciales, sino que hay que observar su concierto con las superiores.”**

*Carta Filosófica.  
Miguel Sendivogius.*



## 9. Bibliografía

---

1. The Merck Index. An Encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Published by Merck Co. Inc. Eleventh edition. USA. 1989 páginas: 760,761.
2. Christian, Gary g. Química Analítica. Editorial Limusa. México. 1993 página 237.
3. Ayres, Gilbert H. Análisis Químico Cuantitativo. Primera reimpresión. Editorial Harla. México. 1975. páginas: 418-419, 421, 423, 649, 650.
4. Orozco, D. Fernando. Análisis Químico Cuantitativo. Octava edición. Editorial Porrúa. México. 1975. Páginas 401-403.
5. Harris, Daniel C. Análisis Químico Cuantitativo. Tercera edición en español. Editorial Iberoamérica. México. 1992. Páginas 399-401, 408.
6. Galindo Fentanes, Enrique. Electroodos biológicos. *Ciencia y Desarrollo*. Noviembre-Diciembre. 1986, XII, 71, 37-54.
7. Czaban, Jhon D. Electrochemical Sensros in Clinical Cemistry: Yesterday, Today, Tomorrow. *Analytical Chemistry*. 1985; 57, 2, 345 A - 356 A.
8. Recchnitz, G.A. Bioanálisis with Potenciometric Membrane Electrodes. *Analytical Chemistry*. September, 1982; 54, 11 , 1194 A- 1200 A.
9. Bioquímica de Harper. Interamericana. México. 1989 páginas: 135 - 141, 827, 828.

10. Ruzicka, Jaromir. The seventies- golden age for Ion Selective Electrodes. *J. of Chem. Educ.* 1997, **74** (2), 167-170.
11. Rechnitz, Garry A. Ion and bio- selective membrane electrodes. *J. of Chem. Educ.* 1983, **60**, 4, 282-284.
12. Frant, Martin S. Where did ion selective electrodes come from?. The story of their development and commercialization. *J. of Chem. Educ.* 1997, **74**, 2, 159-166.
13. Young, C. C. Evolution of blood chemistry analyzers based on ion selective electrodes. *J of Chem. Educ.* 1997, **74**, 2, 177-182.
14. Chan, W. H.; Wong, M. S. y Yip, W. Ion selective electrode in organic analysis. *J of Chem. Educ.* 1986, **63**, 10; 915,916.
15. Frew, Jane; Allen, H. y Hill O. Electrochemical biosensors. *Anal. Chem.* 1987,**59**, 15, 1, 933A-944A.
16. Mulchandani, Ashok. Principles of enzyme biosensors. Methods in Biotechnology, Vol. 6: Enzyme and microbial biosensors: Techniques and protocols. Edited by: A. Mulchandani and K.R. Rogers. Humana Press. Totowa, N. J. Pág. 3-14.
17. Luong, J.H.T.; Groom, C.A. y Male,K.B. The potential role of biosensors in the food and drink industries. *Biosensor. Biocheelectron.* 1991, **6**,547-554.
18. Carr,P. W. y Bowens, L. D. Immobilized enzymes, in Analytical Chemistry: Fundamentals and Applications. Wiley, New York. 1980.
19. Mattiasson, B., Daanielson; B.; Mandenius, C.F. y Winquist, F. Enzyme thermistors for process control. *Ann. NY Acad. Sci.* 1981,**369**, 295-305.
20. Scheper, T.; Brandes, W; Grau, C. y otros. Applications of biosensor systems for bioprocess monitoring. *Anal Chim. Acta.* 1991, **249**, 25-34.
21. Rogers, IK. R.; Valdes J.J.; Eldefrawi, A. T. y Aldefrawi, M. E. Acetylcholinesterase fiber-optic biosensor for detection of anticholinesterases. *Fund. Appl. Toxicol.* 1991, **16**, 810-820.
22. Gautier, S. M.; Blum, L. J. y Coulet, P.R. Fibre-optic sensor based on luminescence and immobilized enzymes. *Biolumin. Chemilumin.* 1990,**5**, 57-63.
23. Cattaneo, M.V. y Luong, L.H. T. Monitoring glutamine in animal cell cultures using a chemiluminescence fiber-optic biosensor. *Biotechnol. Bioeng*. 1993, **41**, 659-665.
24. Arnold, M. A. Fluorophore- and chromophore-based biosensors, in Biosensors Principles and Applications (Blum L. J. y Coulet, P. R., eds. ), Marcel Dekker, New York. pp. 195-212.

- 
25. Czaban, John D. Electrochemical sensors in clinical chemistry: yesterday, today, tomorrow. *Anal. Chem.* 1985, **57** (2), 345A-356A.
26. Rechnitz, G. A. Bioanalysis with potentiometric membrane electrodes. *Anal. Chem.* 1982, **54**, 11, Sep, 1194 A-1200 A.
27. Schultz, Jerome S. Biosensors. *Scientific American.* 1991, August, 64-69.
28. Woodward, John. Enzyme biosensors based on the hydrogen peroxide electrode. . *Methods in Biotechnology*, Vol. 6: Enzyme and microbial biosensors: Techniques and protocols. Edited by: A. Mulchandani and K.R. Rogers. Humana Press. Totowa, N. J. 67-79.
29. Davis, J.; Vaughan, D. H. y Cardosi, M. F. Elements of biosensor construction. *Enzyme Microbiol. Technol.* 1995, **17**, 1030-1035.
30. Lo Gorton, Elisabeth Csöregi, y otros. Enzyme biosensors based on electron transfer between electrode and immobilized peroxidases. *Methods in Biotechnology*, Vol. 6 : Enzyme and microbial biosensors: Techniques and protocols. Edited by: A. Mulchandani and K.R. Rogers. Humana Press. Totowa, N. J. 93-120.
31. Xiao Yi; Ju, Huang-Xian y Chen, Hong-Yuan. Hydrogen peroxide sensors based on horseradish peroxidase- labeled Au colloids immobilized on gold electrode surface by cystamina monolayer. *Anal. Chim. Acta.* 1999,**391** (1), 73-82.
32. Kulys, J. y Schmid, R.D. Mediatorless peroxidase electrode and preparation of bioenzyme sensors. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 1990, **24**,305-311
33. Karyakin, A. y Karyakina, E.E. Prussian Blue based artificial peroxidase as a transducer for hydrogen peroxide detection. Application to biosensor. *Sens. Actuators, B* 1999, **b57**(1-3), 268-273.
34. Tatsuma, Tetsu y Watanabe Taadashi. Peroxidase model electrodes: heme peptide modified electrodes as reagentless sensors for hydrogen peroxide. *Anal. Chem.* 1991, **63**, 15(1), 1580-1585.
35. Lenigk, Ralf y otros. Recessed microelectrode array for a microflow through system allowing online multianalyte determination in vivo. *J. Anal. Chem.* 1999, **364** (1-2), 66-71.
36. Sun, Jian Jun; y otros. An enzyme electrode based on the covalently binding of horseradish peroxidase to a self-assembling monolayer modified gold electrode. *Chin. Chem. Lett.* 1998,**9** (2), 157-160.
37. Kunnecke, Wolfgang. Flow analysis cell with a biosensor composed of membranes with immobilized reagents. *PCT Int. Appl. WO 99 36, 786*; 22 Jul 1999. *DE Appl.* **19**, 801, 344, 16 Jan 1998, 21pp.
38. Mizutani, Fumio; y otros. Amperometric biosensors using an enzyme-containing polyion complex. *ACS Symp. Ser.* 1998, **690**. (Polymers in Sensors) 46-56.
39. Xie, Yan; y otros. Palladium-substituted Keggin type polyoxotungstate chemically modified electrode and its catalytic activity toward hydrogen peroxide reduction. *Anal Lett.* 1998, **31**(12), 2009-2024.



- 
40. Xu, Jing-Juan; y otros. A reagentless hydrogen peroxide biosensor based on the coimmobilization of thionine and horseradish peroxidase by their crosslinking with glutaraldehyde on glassy carbon electrode. *Electroanalysis*. 1998, **10**(10), 713-716.
41. Yang, Yifei y Mu, Shaolin. Bioelectrochemical responses of polyaniline horseradish peroxidase electrodes. *J. Electroanal. Chem.* 1997, **432** (1-2), 71-78.
42. Ruan, Chuan M. Y otros. Immobilization of methylene blue using alfa-zirconium phosphate and its application within a reagentless amperometric hydrogen peroxide biosensor. *Electroanalysis*. 1997, **9**(15), 1180-1184.
43. Khoo, Soo Beng; et. al. Electrocatalytic oxidation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at an oxycobalt film modified glassy carbon electrode for fermentation monitoring. *Anal. Chim. Acta.* 1997, **351** (1-3), 133-142.
44. Liu, Haiying; y otros. Characterization of composite membrane of poly(vinyl alcohol) and regenerated silk fibroin for immobilization of horseradish peroxidase and an amperometric nickelocene-mediated sensor sensitive to hydrogen peroxide. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1996, **67** (1), 77-83.
45. Garguilo, M.G.; Huynh, Nhan; Proctor A. y Michael, A. C. Amperometric sensors for peroxide, choline, and acetylcholine based on electron transfer between horseradish peroxidase and a redox polymer. *Anal. Chem.* 1993, **65**, 523-528.
46. Yang, Li.; Janle, E.; Huang, T. y otros. Applications of "wired" peroxidase electrodes for peroxide determination in liquid chromatography coupled to oxidase immobilized enzyme reactors. *Anal. Chem.* 1995, **67**, 1326-1331.
47. Tatsuma T.; Gondaira, M. y Watanabe T. Peroxidase polypyrrole membrane electrodes. *Anal. Chem.* 1992, **64**, 1183-1187.
48. Tatsuma T.; Okawa Y. And Watanabe T. Enzyme monolayer y bilayer-modified tin oxide electrodes for the determination of hydrogen peroxide and glucose. *Anal. Chem.* 1989, **61**, 2352-2355.
49. Csöregi, E., Jönsson-Pettersson, G., y Gorton, L. Mediatorless electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at graphite electrodes chemically modified with peroxidases. *J. Biotechnol.* 1993, **30**, 315-337.
50. Dominguez- Sanchez, P., Tunón-Blanco, P., Fernández-Alvarez, J.M., Smyth, M.R. y O'Kennedy, R. Flow injection analysis of hydrogen peroxide using horseradish peroxidase-modified electrode detection system. *Electroanalysis*. 1990, **2**, 303-308.
51. Zhao, J., Henkens, R. W., Stonehuemer, J., O'Daly, J. P. y Crumbliss, A. L. Direct electron transfer at horseradish peroxidase-colloidal gold modified electrodes. *J. Electroanal. Chem.* 1992, **327**, 109-119.
52. Korell, U. y Spichiger, U.E. Novel membraneless amperometric peroxide biosensor based on tetrathiafulvalene-p-tetracyanoquinodimethane electrode. *Anal. Chem.* 1994, **66**, 510-515.
53. Vidal J. C., Yague, M. A., y Castillo, J. R. A chronoamperometric sensor for hydrogen peroxide based on electron transfer between immobilized horseradish peroxide on glassy carbon electrode and diffusing ferrocene mediator. *Sens. Actuators*. 1994, **B 21**, 135-141.

- 
54. Vreeke, M., Maidan, R., and Heller, A. Hydrogen peroxide and beta-nicotinamide adenine dinucleotide sensing amperometric electrodes based on electrical connection of horseradish peroxidase redox centers to electrodes through a three-dimensional electron relaying polymer network. *Anal. Chem.* 1993, **65**, 523-528.
55. Garguilo, M. G., Huynh, N. Proctor, A. and Michael, A. C. Amperometric sensors for peroxide, choline and acetylcholine based on electron transfer between horseradish peroxidase and redox polymer. *Anal. Chem.* 1993, **65**, 523-528.
56. Wang, Bingquan y otros. Sol-gel thin film immobilized soybean peroxidase biosensor for the amperometric determination of hydrogen peroxide in acid medium. *Anal. Chem.* 1999, **71** (10), 1935-1939.
57. Yang, Zhi y Whang, Zhaizhong. Study of hydrogen peroxide sensor based on polypyrrole film doped with lacunary Dawson-type tungstophosphate( $P_2W_{17}$ ). *Fenxi Huaxue.* 1998, **26**(5), 542-544.
58. Navas Díaz, A.; Ramos Peinado, M.C. y Tonjas Minguez M. C. Sol-gel horseradish peroxidase biosensor for hydrogen peroxide detection by chemiluminescence. *Anal. Chim. Acta.* 1998, **363** (2-3), 221-227
59. Rajendran, Vijay; Csoregi Elizabeth; Okamoto, Yoshii y Goto, Lo. Amperometric peroxide sensor based on horseradish peroxidase and toluidine blue acrylamide polymer in carbon paste. *Anal. Chim. Acta.* 1998, **373**(2-3), 241-251.
60. Bartlett Philip N.; Birkin, Peter R.; Wang, Jin Hai; y otros. Enzyme switch employing direct electrochemical communication between horseradish peroxidase and poly(aniline) film. *Anal. Chem.* 1998, **70** (17) 3685-3694.
61. García M.; Valdez A.; Blanco P. y Tunon, Ivasca A. A poly (o-aminophenol) modified electrode as an amperometric hydrogen peroxide biosensor. *Electrochim. Acta.* 1998, **43** (23), 3533-3539.
62. Horrocks, B. R., Schmidtke, D., Heller, A. y Bard, A. J. Scanning electrochemical microscopy. Enzyme ultramicroelectrodes for the measurement of hydrogen peroxide at surfaces. *Anal. Chem.* 1993, **65**, 3605-3614.
63. Heller, Adam y Vreeke, Mark S. Electrochemical analyte sensors using thermostable peroxidase. *U. S. App.* 540,789, 11 Oct. 1995; 35pp.
64. Han, Shu-Bo; Zhu, Min y Yuan, Zhuo-Bin. Amperometric hydrogen peroxide sensor based on supramolecular inclusion complex of beta-CD polymer, as immobilization matrix. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao* 1999, **20**(7), 1036-1039.
65. Deng, Q. y Dong, S. Mediatorless hydrogen peroxide electrode based on horseradish peroxidase entrapped in poly(o-phenylenediamine). *J. Electroanal. Chem.* 1994, **26**, 287-296.
66. Gorton L., Jönsson-Pettersson, G., Csöregi E., Johansson, K., Dominguez, E., y Marko-Varga, G. Amperometric biosensor based on an apparent direct electron transfer between electrodes and immobilized peroxidases. *Analyst.* 1992, **117**, 1235- 1241.
67. Lindgreen, Annika; y otros. Amperometric detection of phenols using peroxidase-modified graphite electrodes. *Anal. Chim. Acta.* 1997, **347** (1-2), 51-62.

68. Dominguez-Sanchez, P., Miranda-Ordieres, A. J., Costa-García, A., y Tunon-Blanco, P. Peroxidase-ferrocene modified carbon paste electrode as an amperometric sensor for the hydrogen peroxide assay. *Electroanalysis*. 1991, **5**, 575-579.
69. Popescu, I. C., Csöregi, E., y Gorton, L. Peroxidase modified carbon paste microelectrode as amperometric fi-detector for peroxides in partial aqueous media. *Electroanalysis*. 1996, **8**, 1014-1019.
70. Popescu, I. C., Zetterberg, G., y Gorton, L. Influence of graphite powder, additives and enzyme immobilization procedures on a mediatorless hrp-modified carbon paste for amperometric flow-injection detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Biosens. Bioelectron*. 1995, **309**, 35-45.
71. Wollenberger, U., Wang, J., Ozsoz, M., Gonzalez-Romero, E., and Scheller, F. Bulk modified enzyme electrodes for reagentless detection of peroxides. *Bioelectrochem. Bioenerg*. 1991, **26**, 287-296.
72. Zulfikar, Hibbert, D. B., and Alexander, P. W. A tubular graphite-epoxy electrode incorporating horseradish peroxidase as a potentiometric sensor for hydrogen peroxide. *Electroanalysis*. 1995, **7**, 722-725.
73. Wang, J. y Lin, M. S. Horseradish-root-modified carbon paste bioelectrode. *Electroanalysis*. 1989, **1**, 43-48.
74. Rosatto, Simone y otros. Biosensor for phenol based on the direct electron transfer blocking of peroxidase immobilising on silica-titanium. *Anal. Chim. Acta*. 1999, **390**(1-3), 65-72.
75. Wang, Yu; Huang, Jun Hua; Zhang, Chum Guang; y otros. Determination of hydrogen peroxide in rainwater by using a polyaniline and platinum particles co-modified carbon fiber microelectrode. *Electroanalysis*. 1988, **10** (11), 776-778.
76. Schachl, Klemens; y otros. Amperometric determination of hydrogen peroxide with a manganese dioxide film-modified screen printed carbon electrode. *J. Anal. Chem*. 1998, **362** (2), 192-200.
77. Schachl, Klemens; y otros. Determination of hydrogen peroxide with sensor based on heterogenous carbon materials modified with manganese dioxide. *Sci. Pap. Univ. Pardubice, Ser. A*. 1997 (Pub.1998), **3**, 41-55.
78. Reagentless hydrogen peroxide and L-lactate sensors based on carbon paste electrodes modified with different peroxidases and lactate peroxidases. *J. Prakt. Chem*. 1997, **339**(7), 607-614.
79. Yoon, Ki-Joong; Sang-Yong, Kwon y Hyo-Shik, J. Chicken liver tissue-based amperometric biosensors for the determination of hydrogen peroxide. *Korean Chem. Soc*. 1997, **41**(7), 343-350.
80. Oungpipat, W., Alexander, P.W., y Southwell-Keely, P. A reagentless amperometric biosensor for hydrogen peroxide determination based on asparagus tissue and ferrocene mediation. *Anal. Chim. Acta*. 1995, **309**, 35-45.

81. Chen, L., Lin., M. S., Hara, M. y Rechnitz, G. A. Kohlrabi-based amperometric biosensor for hydrogen peroxide measurement. *Anal. Lett.* 1991, **24**, 1-14.
82. Navaratne, A. y Rechnitz, G. A. Improved plant tissue-based biosensor using in vitro cultured tobacco callus tissue. *Anal. Chim. Acta.* 1992, **257**, 59-66.
83. Tatsuma, T.; Watanabe T.; Tatsuma S. y Watanabe T. Substrate-purping enzyme electrodes. Peroxidase/Catalase electrodes for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with an improved upper sensing limit. *Anal. Chem.* 1994, **66**, 290-294.
84. Kimbrough, Doris; Magoun, Mary Ann y Langfur, Meg. A Laboratory Experiment Investigating Different Aspects of Catalase Activity in an inquiry-Based Approach. *J. Chem. Educ.* 1997; **74**, 2, 210-212.
85. HART, Leslie y JHONSTONE FISHER, Harry. Análisis moderno de los alimentos. Primera reimpresión. Editorial Acribia. España. 1984.
86. Dilibaer, Deng Jiaqui. Potato tissue biosensor for hydrogen peroxide. *Fexi Kexue Xueba.* 1994, **10(2)**, 53-56.
87. <http://intel.ucc.ie/sensors/universal/index.html>.



**Escucha mi voz de niño,  
cuando digo : Rebeldía.**

***S. M.***