

Desarrollo de Biosensores Amperométricos Serigrafiados Modificados con materiales Híbridos Metal-Grafito, Portátiles y de Bajo Costo Para la Detección de Ácido Láctico.

Jorge A. Londoño-Torres., Oscar A. Loaiza., William H. Lizcano-Valbuena.

Departamento de Química; Ciudad Universitaria Meléndez, A.A. 25360, Cali, Colombia.

E-mail: jorge.londono@correounivalle.edu.co

PALABRAS CLAVE: Biosensor, ácido láctico, voltamperometría, cronoamperometría, catálisis.

ABSTRACT: Este trabajo describe la construcción de tres biosensores serigrafiados amperométricos para la detección y cuantificación de lactato, la fabricación del biosensor se llevó a cabo utilizando nanopartículas de Pt y Pt-Ru soportadas en polvo de grafito Vulcan XC-72®, los biosensores fueron fabricados por inmovilización física de la enzima lactato oxidasa (LOX) sobre la superficie de electrodos serigrafiados modificados con los híbridos dispersados en cloruro de polidialildimetilamonio (PDDA). Los biosensores obtenidos muestran límites de detección de 8,55 $\mu\text{mol/L}$ para el biosensor Pt/Vulcan, 8,76 $\mu\text{mol/L}$ para el biosensor PtRu/Vulcan 14-7 y 4,05 $\mu\text{mol/L}$ para el biosensor PtRu/Vulcan 10-10.

El ácido láctico es un ácido orgánico presente en el organismo generalmente en su forma ionizada, siendo un metabolito bastante importante para los procesos bioquímicos como lo son ciclos metabólicos como la glucólisis y la gluconeogénesis, principalmente relacionado a la producción de energía, su concentración está directamente ligada a la cantidad de oxígeno disponible ya que para los procesos aeróbicos, el piruvato producido de la descomposición del lactato es transformado en Acetil coenzima A ingresando al ciclo de Krebs para producir finalmente CO_2 y agua.¹

En esta última década, se ha descubierto que tanto el lactato como el piruvato, son marcadores biológicos que se asocian a condiciones médicas tales como la hipoxia tisular y otras enfermedades², es por eso que los métodos para la detección de este metabolito se han convertido en una de las aplicaciones más buscadas en el campo del diagnóstico clínico, buscándose metodologías de cuantificación económicas, sensibles y de alta especificidad.

En química analítica se han diseñados dispositivos que cumplen estas características conocidos como sensores, los sensores son dispositivos portátiles que permiten la cuantificación de muchos fenómenos físicos y químicos en tiempo real, dentro de este vasto grupo de dispositivos, se destacan los biosensores, que aparte de contar con las ventajas de los métodos electroanalíticos, como lo son las altas sensibilidades y sus bajos costos de instrumentación, estos son altamente específicos ya que la unidad de bioreconocimiento generalmente

inmovilizada en la superficie del sensor reacciona únicamente con el analito en cuestión.

En este trabajo se realizaron diferentes biosensores amperométricos para la detección de lactato utilizando la enzima lactato oxidasa inmovilizada sobre un electrodo impreso por la técnica de impresión en película gruesa (screen printing) en una máquina de serigrafía de medio pliego con tintas de grafito para los electrodos de trabajo y auxiliar y de Ag/AgCl como electrodo de referencia, para la modificación de estas plataformas, la superficie del electrodo de trabajo fue modificada con tres materiales híbridos de Pt y PtRu soportados en polvo de carbón Vulcan XC-72® (Pt/Vulcan, PtRu/Vulcan) sobre la cual se inmovilizó físicamente una solución de Lactato Oxidasa

REACTIVOS.

Acido cloroplátinico (8%), CAS 16941-12-1, Cloruro de rutenio (III), CAS 14898-67-0, Hidróxido de potasio, CAS 1310-58-3, L-lactato de sodio (99%), CAS 212-762-3, Cloruro de poli(dialildimetilamonio) (20%) CAS 26062-79-3, suministrados por Sigma Aldrich, Vulcan® XC72, suministrado por Merck CAS 1333-86-4, Etilenglicol (99,8%) suministrado por Mallinckrodt, CAS 107-21-1, Lactato oxidasa liofilizada (LOX), suministrada por Sorachim, CAS 9028-72-2.

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron grado analítico, así como el agua fue purificada por un sistema Milli-Q Millipore.

EQUIPOS

Potensiostato Autolab PGSTAT 204 empleando el software Nova 1.11, Ultrasonido Branson 1510, Horno microondas Whirpool WMH32519CS, Impresora Derjor de medio pliego, Perfilómetro Rancord D-120, Microscopio electrónico de barrido con módulo de espectroscopía EDS JEOL JSM-6490LV.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Construcción de las plataformas sensoras. El primer paso para la creación del sensor, fue la construcción de las plataformas electrónicas, para esto se diseñaron tres plantillas en el software Corell Draw® que fueron impresas posteriormente en un sustrato plástico termoresistente PET (Polietilenterftalato) con una máquina de serigrafía marca Derjor.

Este material fue activado térmicamente en un horno de convección forzada a una temperatura de 130°C por un tiempo de 10 minutos, este proceso se repitió con cada capa de tinta aplicada, las tintas utilizadas fueron de Ag/AgCl, grafito y una tinta dieléctrica basándose en la metodología utilizada por Loaiza-Lamas³.

Determinación del grosor de las capas de tinta en las plataformas sensoras. Una vez impresos los electrodos, se procedió a caracterizar el grosor de las capas de tinta aplicadas utilizando un perfilómetro KLA Tancord D-120 propiedad del laboratorio de recubrimientos duros de la Facultad de Ingeniería de la Universidad del Valle, los datos fueron compilados a una velocidad de barrido de 0,1 mm/s hasta un máximo de 400 µm

Caracterización electroquímica de los electrodos serigrafiados sin modificar. Con el sentido de corroborar el correcto funcionamiento de las plataformas sensoras, se caracterizó una muestra de 20 electrodos desnudos por medio de voltamperometrías cíclicas utilizando soluciones de hidroquinona 1,0 mmol/L en buffer de fosfato con pH 7,0 y ferricianuro de potasio 1,0 mmol/L en H₂SO₄ 0,1 mol/L, con una velocidad de barrido de 0.1 V/s para las medidas voltamperométricas, todos los datos fueron obtenidos a una temperatura de 25 °C.

Síntesis del material híbrido Pt/Vulcan. Habiéndose caracterizado la superficie de los electrodos, el siguiente paso para la construcción de los biosensores fue la síntesis de los materiales híbridos se prepararon mediante la síntesis asistida por microondas de las nanopartículas en medio básico usando etilenglicol

utilizado en los trabajos de Chen- Lee- Liu⁴, para esto se tomaron 40 mg de Vulcan XC-72 que se dispersó en 25 mL de etilenglicol por sonicado durante 30 minutos.

Luego, la dispersión se mezcló con 2,5 mL de una solución acuosa de H₂PtCl₆ 1% (w/w) y 0,5 mL de KOH 0,8 mol/L (agregados gota a gota) para finalmente ser puesta en un horno microondas de uso doméstico (Whirpool) por 60 segundos.

La solución resultante se filtró con filtros de acetato de celulosa con tamaño de poro igual a 0,22 µm y se lavó con 800 mL de agua obtenida mediante un sistema Mili-Q Millipore, finalmente el filtrado se llevó a un horno marca Quimis® a 60° C por 40 minutos.⁴

Se utilizó el método de redisolución de CO para evidenciar la presencia de platino en la composición del material sintetizado, para esto se usó un electrodo de carbono vitrificado sobre el cual se depositaron 50 µL de la dispersión del material híbrido los cuales una vez secos se sometieron a Voltamperometría cíclica en un rango de potenciales desde 0 hasta 1 V y se realizaron 10 barridos sucesivos⁵.

Síntesis de los materiales híbridos PtRu/Vulcan. De forma paralela, para la síntesis de estos materiales bimetalicos se realizó un proceso análogo al descrito en la síntesis del material Pt/Vulcan utilizando como precursores una solución de H₂PtCl₆ 1% en H₂O y RuCl₃ en estado sólido, la dispersión se realizó de igual manera salvo por el hecho de la adición inmediata de la sal de rutenio después de la incorporación del H₂PtCl₆.⁶

Análisis de oxidación de CO sobre la superficie de los materiales híbridos. Una vez sintetizados los materiales, se decidió comprobar la presencia de platino en la dispersión híbrida, para este análisis se utilizó un electrodo de carbón vitrificado sobre el cual se depositaron 50 µL de una solución de 1 mg/ml del material híbrido, una vez seca la superficie, el electrodo fue puesto en una celda electroquímica en la cual fue burbujeadado CO en una solución 0,5 M de H₂SO₄ y argón como gas de arrastre, después de 5 minutos se realizaron estudios voltamperométricos.

Espectroscopía de energía dispersiva (EDS). Posteriormente, se cuantificó la cantidad de platino anclada sobre la superficie del grafito Vulcan de la dispersión preparada, para eso se utilizó la técnica de EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) cuyos espectros fueron tomados en la escuela de ingeniería de materiales en la Universidad del Valle en un microscopio electrónico de barrido con los que se construyó la tabla 2. Donde se muestran los resultados obtenidos en este análisis⁷.

Determinación de la Concentración y potencial óptimo de medida para H_2O_2 en los electrodos modificados con los híbridos metálicos. Para modificar la superficie electródica, se llevó a cabo una dispersión acuosa del híbrido con 1% de PDDA (cloruro de polidialildimetilamonio), la superficie fue modificada con 2, 4, 6, 8 y 10 μL de la dispersión del híbrido y se realizaron voltamperometrías cíclicas y cronoamperometrías por un minuto a diferentes potenciales para encontrar la concentración óptima de H_2O_2 y el potencial óptimo de medida.

Curva de calibración y límites de detección y cuantificación de H_2O_2 en los electrodos modificados con los materiales híbridos. Una vez encontrados las mejores condiciones de medida para los electrodos modificados con los híbridos de Pt/Vulcan y PtRu/Vulcan, se realizó una curva de calibración para concentraciones de H_2O_2 para cada uno de los sensores modificados en un rango de concentraciones de 10 $\mu mol/L$ a 10000 μmol .

Preparación de biosensores. Como paso final para la preparación de los biosensores, se preparó una solución 1 u/ μL de la enzima lactato oxidasa en solución reguladora 0,1 M de HPO_4^-/PO_4^{2-} a pH 7,0 y 2 μL de esta fueron depositados directamente sobre la superficie de los electrodos modificados con los materiales híbridos y se realizaron lavados de la superficie con la solución de buffer pH 7,0 preparada anteriormente.³

Una vez inmovilizada la enzima en el electrodo de trabajo del sensor, se caracterizaron estos biosensores con Voltamperometría cíclica de 2,5 mM de una solución L-lactato de sodio y las curvas de calibración construídas para estos se realizó utilizando rangos de concentraciones de L-lactato de sodio desde 10 μM hasta 10000 μM siguiendo los procedimientos descritos anteriormente para los electrodos modificados con los híbridos metálicos.⁸

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos perfilométricos recopilados para cada una de las capas de los electrodos serigrafados fueron de 40 μm para la capa de aislante dieléctrico, 40 μm para la capa de Ag/AgCl y 15 μm para la capa de grafito, estos datos fueron tabulados en la tabla 1. Esto se realizó para conocer las dimensiones de los electrodos impresos.

Tabla 1. Datos perfilométricos de los electrodos desnudos

Capa	Grosor (μm)	Función
Grafito	15	Electrodo de trabajo/semireferencia
Ag/AgCl	40	Electrodo de referencia
Tinta dieléctrica	40	Aislante

En la figura 1. Se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos con los electrodos fabricados antes de su modificación, esto con el fin de establecer los potenciales de oxidación y reducción de dos modelos redox muy conocidos en química electroanalítica, el modelo fericianuro de potasio y el modelo hidroquinona.

Para la hidroquinona, se registró un pico anódico promedio de 0,21 V, un pico catódico promedio de -0,37 V, y un ΔE_p promedio de -0,58 V, finalmente para el ferriicianuro de potasio se encontraron los valores promedio de 0,23 V, 0,108 V y -0,12 V para los picos anódico, catódico y ΔE_p respectivamente.

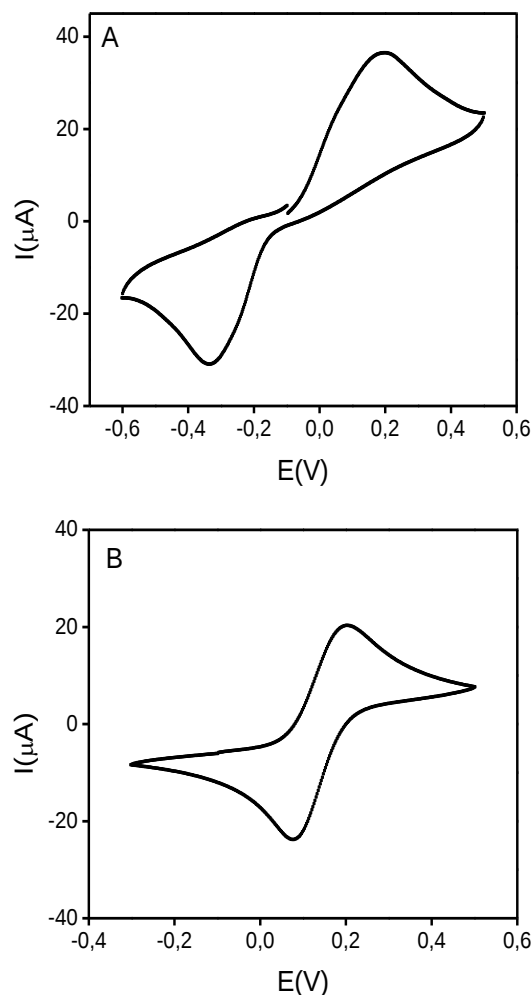


Figura 1. Voltamperograma cíclico de A) Hidroquinona 1 mM en Buffer fosfato pH= 7,0/ electrodo desnudo. B) $K_3Fe(CN)_6$ 1mM en H_2SO_4 0,1 M/ electrodo desnudo.

Dichos potenciales sufrieron desplazamientos positivos de 0,1 V con respecto a los reportados en la literatura⁹ lo cual puede atribuirse a la diferencia a que los electrodos fabricados, utilizan una tinta de Ag/AgCl como electrodo de referencia la cual posee un potencial diferente a la solución saturada de Ag/AgCl como lo expone Fanjul en su trabajo sobre este tema¹⁰, sin embargo los valores de $\Delta\epsilon$ se muestran inalterados, sugiriendo que la comparación entre ambos resultados es posible¹¹.

En la figura 2. Se puede apreciar el perfil voltamperométrico del análisis de la oxidación de una monocapa de CO sobre la superficie de los materiales híbridos donde el pico de oxidación registrado en +0,8 V vs. AgCl corresponde al pico de oxidación sobre el platino evidenciando así la presencia de dicho elemento en el material que es el que permite la catálisis del peróxido de hidrógeno producto de la descomposición del lactato de sodio en la reacción bioquímica¹².

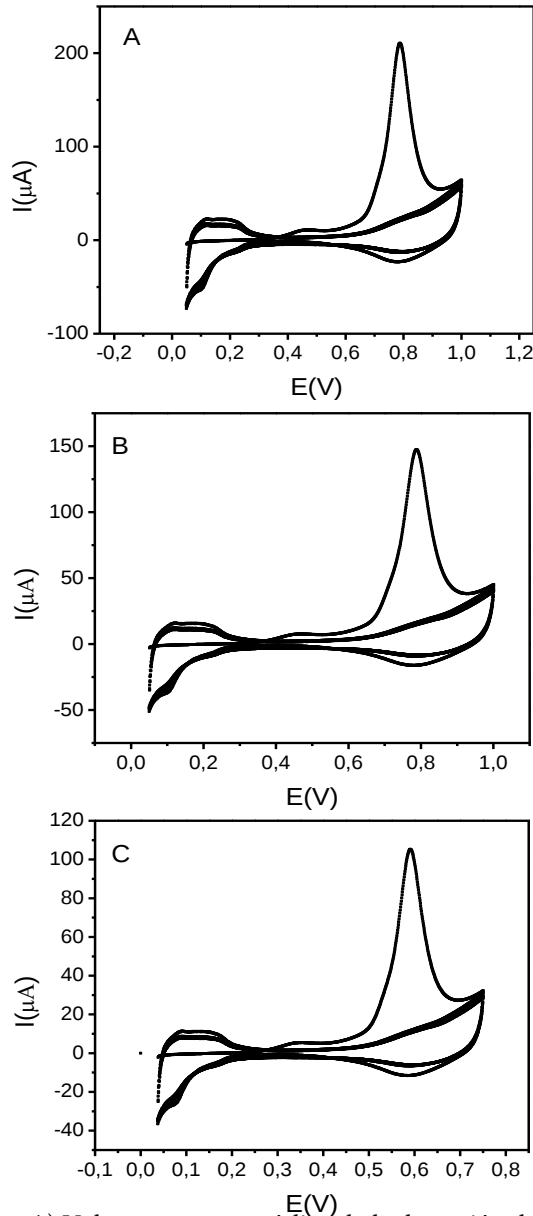


Figura 3. A) Voltamperogramacíclico de la desorción de CO en el material Pt/Vulcan, B) Voltamperograma cíclico de la desorción de CO en el material PtRu/Vulcan 14-7, C) Voltamperograma cíclico de la desorción de CO en el material PtRu/Vulcan 50-50.

Tabla 2. Cantidad de platino encontrado en los materiales por medio de la técnica EDS.

Material híbrido	Platino(% w/w)
Pt/Vulcan	19
PtRu/Vulcan 14-7	13
PtRu/Vulcan 10-10	10

Una vez comprobada la presencia de platino en los materiales híbridos como se expuso en la tabla 2. Se pasó a realizar una serie de pruebas voltamperométricas con los electrodos modificados con el material utilizando 1% del polímero catiónico PDDA como agente dispersante¹³.

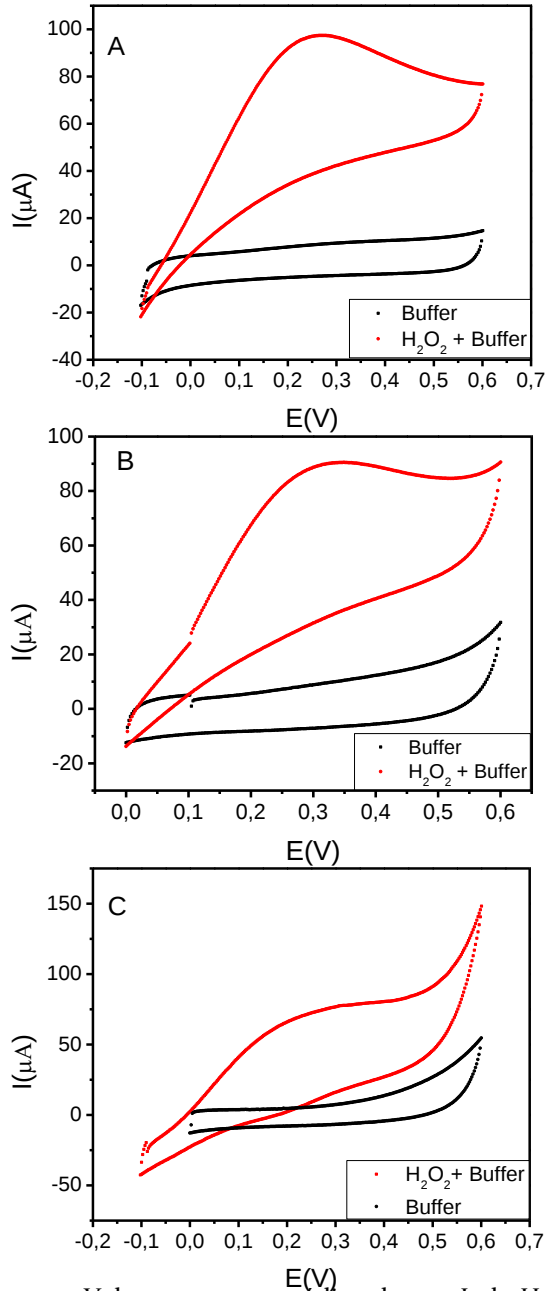


Figura 3. Voltamperograma cíclico de 50 μ L de H_2O_2 2,5 mmol/L sobre electrodo modificado con 4 μ L de una solución 1 mg/mL de A) Pt/Vulcan, B) PtRu/Vulcan 14-7 , C) PtRu/Vulcan 10-10.

Como se observa en la figura 3. El perfil voltamperométrico del peróxido de hidrógeno se diferencia totalmente de aquel tomado solo con el buffer fosfato en el mismo sensor modificado con los materiales híbridos, evidenciando el proceso de oxidación catalizado por platino en el material y mostrando la eficacia de los materiales híbridos como catalizadores útiles en la descomposición del peróxido de hidrógeno¹⁴.

Finalmente, para terminar la caracterización de los materiales híbridos, se realizaron diferentes estudios cronoamperométricos. La figura 4. muestra los resultados obtenidos de diferentes electrodos utilizando diferentes cantidades de cada uno de los híbridos en un rango de potenciales desde -0,1 V hasta +0,5 V (Vs electrodo de semireferencia de Ag/AgCl) encontrándose para estos sensores una corriente constante en el intervalo de +0,1 a +0,3 V.

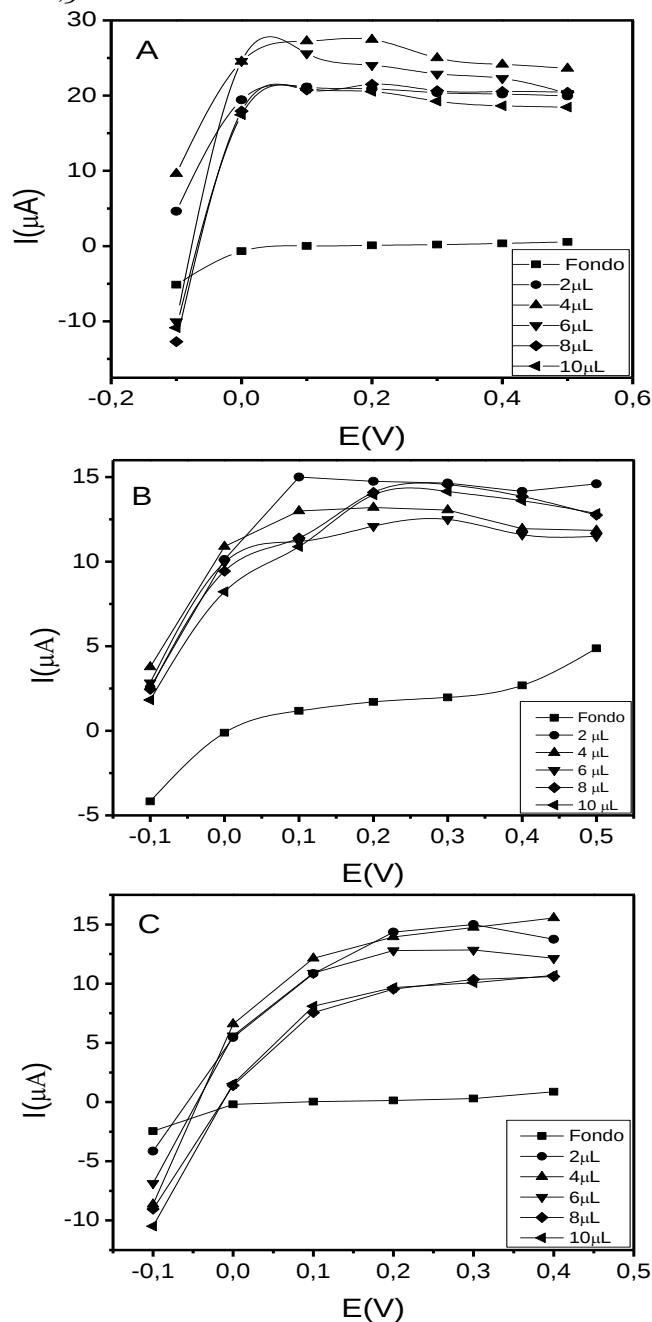


Figura 4. Curvas de corriente Vs potencial aplicado para cada una de las concentraciones en el material A) Pt/Vulcan, B) PtRu/Vulcan 14-7, C) PtRu/Vulcan 10-10.

Contrario al comportamiento esperado, la intensidad de corriente de las cronoamperometrías mostradas en la figura 4. no aumenta sustancialmente a medida que se aumenta la cantidad de material depositado en la superficie del electrodo de trabajo, esto se debe a que si la cantidad de material impregnado es muy elevada, la superficie del sensor es totalmente cubierta por el híbrido produciendo un aumento de grosor en la capa superficial del electrodo dificultando así la difusión del analito en el mismo llevando a pérdidas de sensibilidad en las mediciones¹⁵.

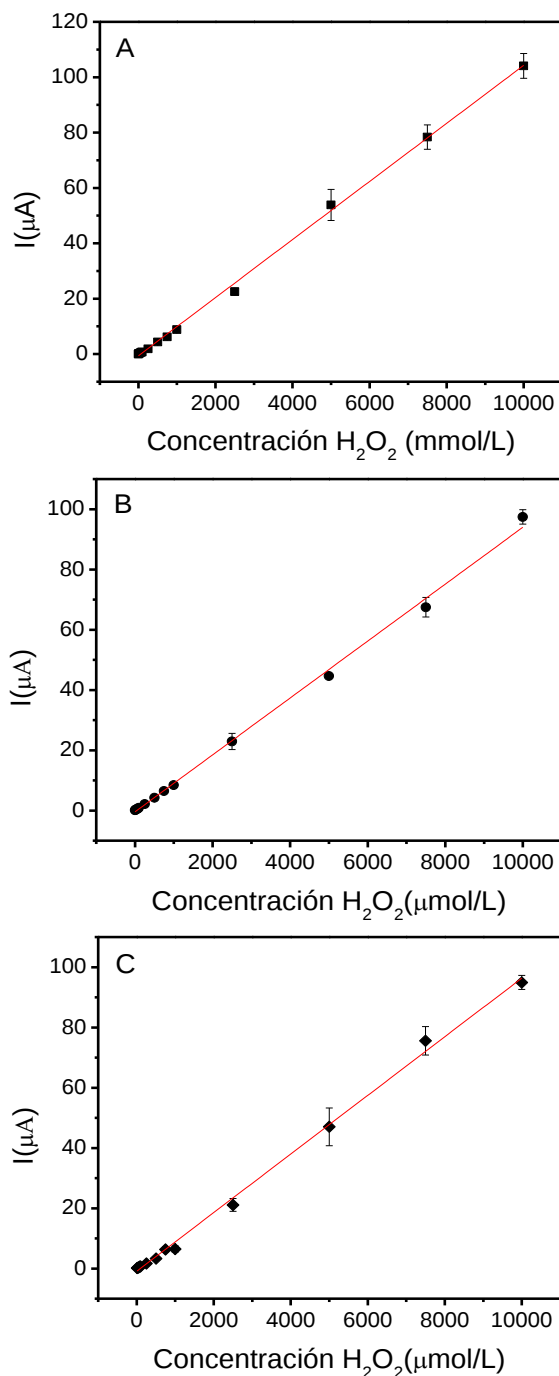
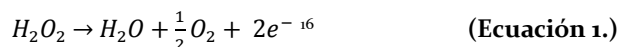


Figura 5. Curva de calibración para la detección de H_2O_2 en los electrodos modificado con A) Pt/Vulcan, B) PtRu/Vulcan 14-7, C) PtRu/Vulcan 10-10.

Una vez establecidas las mejores condiciones de medida para los parámetros establecidos en los sensores, para esto se escogió un rango de potenciales donde la intensidad de corriente fue constante arrojando como resultado un rango desde + 0,1 V hasta +0,3 V y para la cantidad de híbrido aplicado se escogió aquella que mostrara mayor intensidad de corriente dentro del rango de potencial escogido.

Una vez determinado esto, se procedió a realizar una curva de calibración de soluciones de H_2O_2 en buffer fosfato a pH 7,0 con el fin de determinar la sensibilidad y la robustez de los sensores fabricados; estas soluciones fueron puestas en un baño de hielo de manera inmediata a su preparación con el fin de prevenir la degradación espontánea del peróxido en agua y oxígeno



Posteriormente se calcularon los límites de detección utilizando las ecuaciones de las recta obtenidas siguiendo la ecuación $YDL = b + \frac{3SD_b}{a}$ donde SD_b es la desviación estándar del blanco, b es la corriente arrojada por el blanco, que en este caso es cero y a es la pendiente de la curva, finalmente se utilizó la ecuación $YDL = b + \frac{10SD_b}{a}$ para encontrar los límites de cuantificación¹⁷, estos datos fueron tabulados en la tabla 3.

Tabla 3. Límites de detección y cuantificación de H_2O_2 con electrodos modificados con los híbridos metálicos.

Híbrido	LDD ($\mu\text{mol/L}$)	LDC ($\mu\text{mol/L}$)	Sensibilidad (A^*L/mol)
Pt/Vulcan	0,61	2,04	1,05E-02
PtRu/Vulan 14-7	6,27	20,09	9,94E-03
PtRu/Vulca n 10-10	5,08	16,93	9,73E-03

Se utilizó un potencial de 0,15 V (dentro del rango de potenciales encontrado anteriormente) para todas las medidas posteriores, respecto a la cantidad óptima del material híbrido, los resultados fueron diferentes para los electrodos modificados con el híbrido Pt/Vulcan en comparación de los electrodos modificados con los materiales PtRu/Vulcan, encontrándose una cantidad óptima de 4 μL para el primero mientras que para los últimos esta cantidad fue de 2 μL , lo que indica una influencia del átomo de rutenio en el comportamiento electroquímico del sensor lo que puede ser atribuido al efecto de controlar el crecimiento de las partículas metálicas de platino generando un aumento del área superficial⁸, incrementando así el número de centros catalíticos, este fenómeno se ha observado ampliamente en los trabajos de Misra et.al.¹⁹

Sin embargo, la intensidad de corriente alcanzada por los electrodos modificados con Pt/Vulcan en el posterior estudio voltamperométrico es aproximadamente el doble

de la intensidad registrada por los electrodos modificados con los materiales basados en PtRu/Vulcan en sus mejores condiciones de medida, esto sugiere que el átomo de rutenio causa una interferencia en el proceso catalítico que favorece a la disminución de la velocidad de reacción en el material híbrido¹⁸.

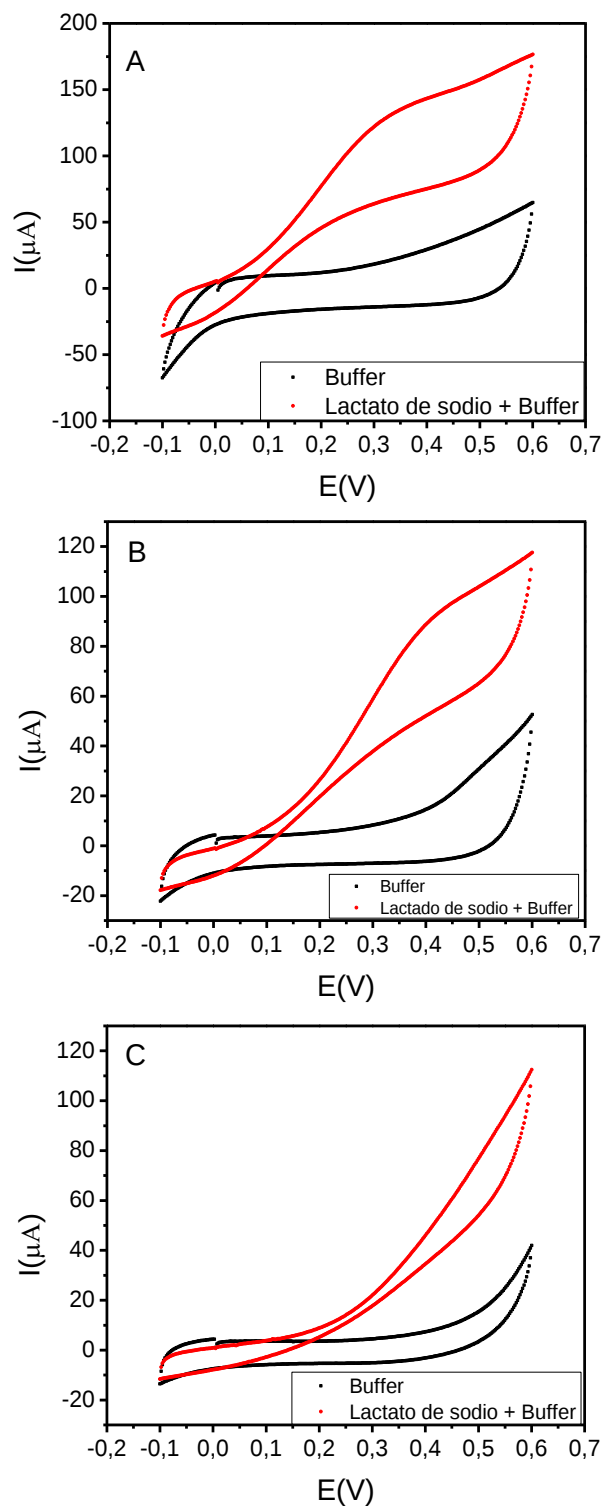
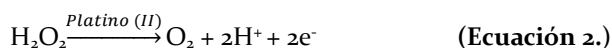


Figura 6. Voltamperograma cíclico de 50 μL de lactato de sodio 2,5 mM en los biosensores conteniendo A)Pt/Vulcan, B) PtRu/Vulcan 14-7, C) PtRu/Vulcan 10-10.

Se realizaron diez medidas utilizando cada electrodo, lavando el electrodo entre cada medida, la corriente permaneció constante, sugiriendo la adherencia de la enzima en la superficie electródica²⁰, esto se debe a los procesos de adsorción no específica, que son fenómenos iónicos repulsivos o atractivos que son producidos en función de la proximidad de una sustancia cargada a una superficie, dicho fenómeno es el responsable de la fisisorción de la enzima lactato oxidasa sobre la superficie del sensor modificado²¹.

Por otra parte, el PDDA es un polímero catiónico que refuerza la atracción electrostática de la enzima con el sustrato permitiendo la readsorción enzimática sobre la superficie del electrodo de trabajo haciendo posible la reutilización del biosensor una vez que el la plataforma se ha secado²².

Comparando las intensidades de corriente registrada en los voltamperogramas cíclicos de cada uno de los biosensores preparados, se puede observar que es el biosensor Pt/Vulcan aquel que alcanza mayores valores comparados con los biosensores modificados con los materiales PtRu/Vulcan, lo que significa que es el biosensor con mayor poder catalítico para la oxidación enzimática del L-lactato de sodio y su conversión en piruvato de sodio y peróxido de hidrógeno, por lo que después de producido este compuesto el material adherido a la superficie ejerce de agente catalizador en el proceso de descomposición de este subproducto, generando electrones que producen una intensidad de corriente cuantificable cuando se aplica una diferencia de potencial eléctrico, siendo coherente con la información reportada por Cargill. A., et al²³.



Posteriormente se realizaron voltamperometrías cíclicas de 50 μL de L-lactato de sodio en diferentes electrodos modificados con los materiales sintetizados sin enzima inmovilizada sobre ellos, lo que demuestra que sin la enzima, el L-lactato de sodio es un compuesto electroquímicamente inerte (ver anexo 3).

Una vez terminados los estudios voltamperométricos se construyó una curva de calibración con diferentes concentraciones de L-lactato para cada uno de los biosensores preparados de manera análoga a la que se construyeron los calibrados de los sensores modificados con los híbridos metálicos, esta vez el rango de concentraciones también fue desde 10 μM hasta 10000 μM pero el comportamiento de la curva fue completamente diferente tal y como se aprecia en la figura 7.

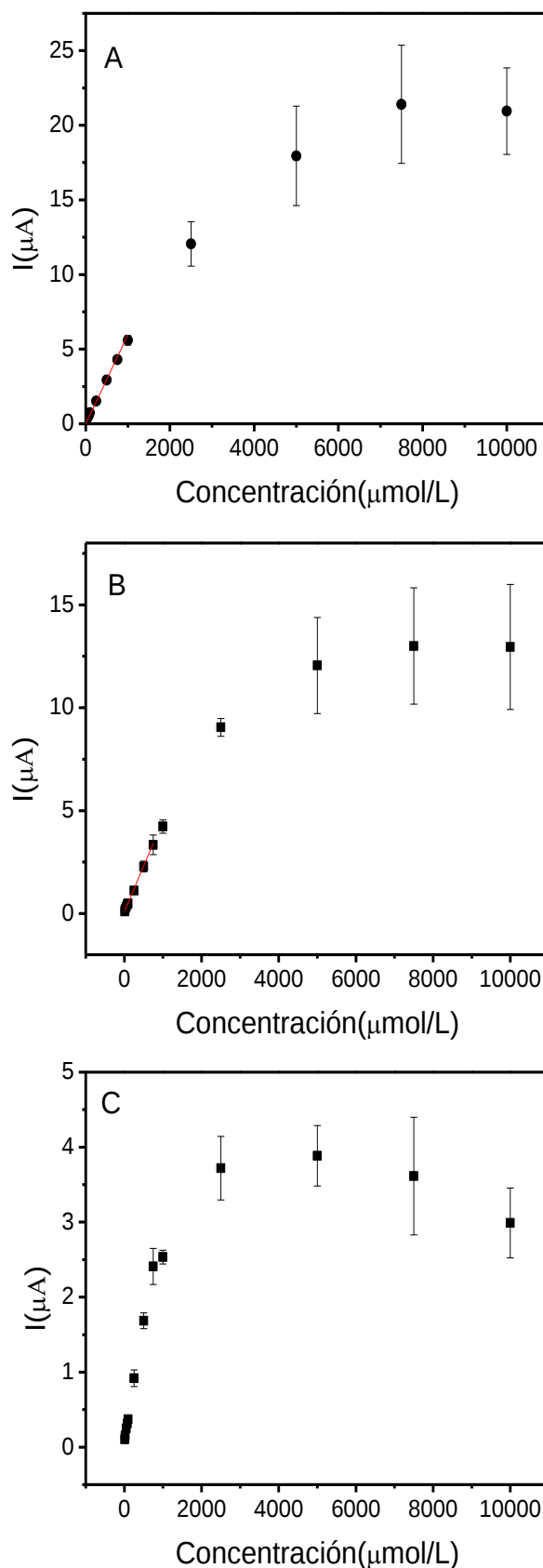


Figura 7. Curva de calibración de L-lactato de sodio en los biosensores conteniendo A) Pt/Vulcan, B) PtRu/Vulcan 14-7, C) PtRu/Vulcan 10-10.

Las curvas mostradas en la figura 7. Para los calibrados de las plataformas biosensóricas difieren significativamente en su forma de las curvas de calibración construidas para los sensores modificados con los materiales híbridos mostradas previamente en la figura 6. Esto se debe a que en sistemas enzimáticos generalmente se aprecia un primer tramo lineal, útil desde el punto de vista analítico, que posteriormente se curva a concentraciones más elevadas como consecuencia de la saturación de la enzima, este fenómeno ha sido observado por diferentes investigadores independientemente del modelo enzimático como es el caso de Bollella. P., et al²⁴, y Panalisamy. S., et al²⁵.

Dada la similitud con el modelo cinético de Michaelis-Menten, se procedió a calcular las constantes cinéticas utilizando la linealización de Lineweaver-Burke del modelo de Michaelis-Menten²⁶ (ver anexo 4) donde K_m es la constante de Michaelis aparente, la cual es la concentración de lactato de sodio a la cual la reacción catalítica alcanza la mitad de su velocidad máxima.

Como resultado, se construyeron curvas (ver anexo 5) de las cuales se partió para la elaboración de la tabla 4. Con los parámetros cinéticos obtenidos al aplicar este modelo, donde se observa que los valores de K_m son consecuentes con los valores de velocidad máxima alcanzados por cada uno de los biosensores fabricados arrojando un índice de correlación igual a la unidad para los biosensores Pt/Vulcan y PtRu/Vulcan 14-7 mientras que solo 0,97 para el biosensor PtRu/Vulcan 10-10 siendo este el más alejado del comportamiento enzimático.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de los biosensores construidos

Biosensor	$K_m(\mu M)$	$V_{max}(\mu A/s)$
Pt/Vulcan	2142	35,7
PtRu/vulcan 14-7	1302	21,7
PtRu/Vulcan 10-10	645	0,65

Finalmente se realizaron estudios de reproducibilidad de los biosensores utilizando una muestra de diez electrodos, los cuales fueron medidos diez veces sucesivas

con el fin de determinar la posible reutilización de las plataformas biosensóricas construidas, estos estudios son mostrados en la figura 11. Y en la tabla 5. Donde son calculados los límites de detección y cuantificación de los biosensores.

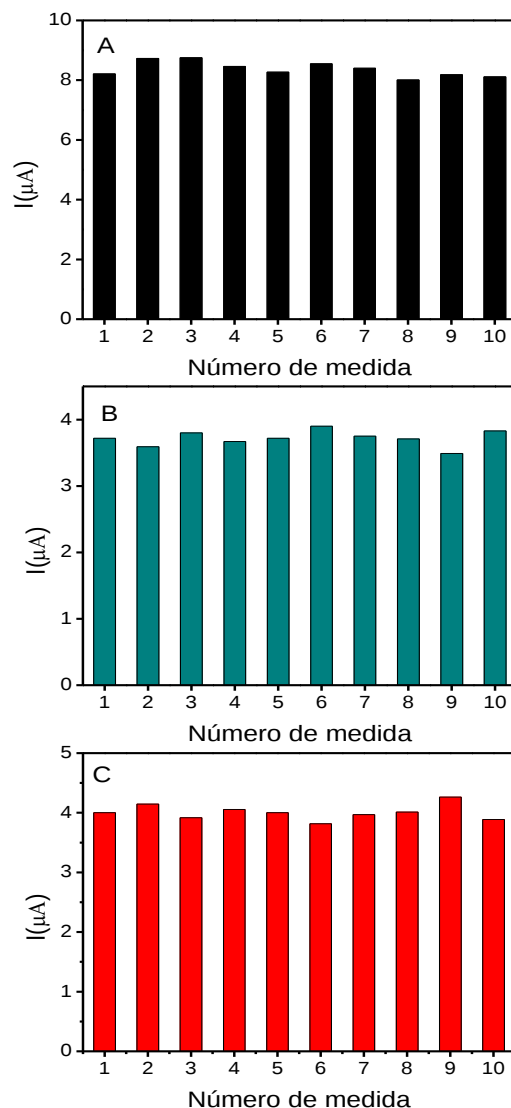


Figura 11. Estudio de reproducibilidad de resultados en los biosensores conteniendo A) Pt/Vulcan, B) PtRu/Vulcan 14-7, C) PtRu/Vulcan 10-10.

Tabla 5. Características analíticas de los biosensores

Biosensor	LDD ($\mu mol/L$)	LDC($\mu mol/L$)	Sensibilidad (A^*L/mol)	Rango lineal ($\mu mol/L$)
Pt/Vulcan	8,55	28,50	$5,46E^{-3}$	10-1000
PtRu/Vulcan 14-7	8,76	29,21	$4,37E^{-3}$	10-1000
PtRu/Vulcan 10-10	4,05	13,50	$3,14E^{-3}$	10-750

CONCLUSIONES

1. Se imprimieron los electrodos serigrafiados y se caracterizaron electroquímicamente, demostrando su aptitud como sensores amperométricos.

2. Se han sintetizado los materiales híbridos Pt/Vulcan, PtRu/Vulcan 14-7 y PtRu/Vulcan 10-10 y se caracterizaron mediante estudios voltamperométricos y cronoamperométricos demostrando la aplicabilidad de los materiales híbridos sintetizados para la detección de peróxido de hidrógeno generado como subproducto de la descomposición enzimática del L-lactato de sodio.

3. Los electrodos preparados con los híbridos de Pt/Vulcan, PtRu/Vulcan 14-7 y PtRu/Vulcan 10-10 mostraron un buen comportamiento electroquímico permitiendo preparar en todos los casos biosensores con buenas características analíticas.

4. De los biosensores desarrollados, los que mejores características presentaron fueron los preparados con las nanopartículas de Pt sin adicionar el segundo metal.

ABREVIATURAS

LOX: Lactato oxidasa, PDDA: Cloruro de poli(dialildimetilamonio), EDS: Energy dispersive spectroscopy, LDD: Límite de detección, LDC: Límite de cuantificación, K_m : Constante de Michaelis-Menten aparente, V_{max} : Velocidad máxima de reacción aparente.

AGRADECIMIENTOS

Al programa “Es tiempo de volver” de COLCIENCIAS (Proyecto M301PR03F03) y a la Universidad del Valle por el apoyo financiero.

REFERENCIAS

1. O'Brien, R. W., Enzymatic analysis of the pathways of glucose catabolism and gluconeogenesis in *Pseudomonas citronellolis*. *Archives of Microbiology* **1975**, *103* (1), 71-76.
2. Merino, M. A.; Sahuquillo, J.; Borrull, A.; Poca, M. A.; Riveiro, M.; Expósito, L., ¿Es el lactato un buen indicador de hipoxia tisular?: Resultados de un estudio piloto en 21 pacientes con un traumatismo craneoencefálico. *Neurocirugía* **2010**, *21*, 289-301.
3. Loaiza, O. A.; Lamas-Ardisana, P. J.; Añorga, L.; Jubete, E.; Ruiz, V.; Borghei, M.; Cabañero, G.; Grande, H. J., Graphitized carbon nanofiber-Pt nanoparticle hybrids as sensitive tool for preparation of screen printing biosensors. Detection of lactate in wines and ciders. *Bioelectrochemistry* **2015**, *101*, 58-65.
4. Chen, W. X.; Lee, J. Y.; Liu, Z., Microwave-assisted synthesis of carbon supported Pt nanoparticles for fuel cell applications. *Chemical Communications* **2002**, (21), 2588-2589.
5. Garrick, T. R.; Moylan, T. E.; Carpenter, M. K.; Kongkanand, A., Editors' Choice—Electrochemically Active Surface Area Measurement of Aged Pt Alloy Catalysts in PEM Fuel Cells by CO Stripping. *Journal of The Electrochemical Society* **2017**, *164* (2), F55-F59.
6. Woo, S.; Lee, J.; Park, S.-K.; Kim, H.; Chung, T. D.; Piao, Y., Enhanced electrocatalysis of PtRu onto graphene separated by Vulcan carbon spacer. *Journal of Power Sources* **2013**, *222*, 261-266.
7. Wilson, A. R.; Lambrianidis, L. T., Compton-scattering X-ray artefacts observed in an STEM with high take-off angle EDS detector. *Journal of Microscopy* **1990**, *160* (1), 1-7.
8. Lamas-Ardisana, P. J.; Loaiza, O. A.; Añorga, L.; Jubete, E.; Borghei, M.; Ruiz, V.; Ochoteco, E.; Cabañero, G.; Grande, H. J., Disposable amperometric biosensor based on lactate oxidase immobilised on platinum

nanoparticle-decorated carbon nanofiber and poly(diallyldimethylammonium chloride) films. *Biosensors and Bioelectronics* **2014**, *56*, 345-351.

9. Beriet, C.; Pletcher, D., A microelectrode study of the mechanism and kinetics of the ferro/ferricyanide couple in aqueous media: The influence of the electrolyte and its concentration. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1993**, *361* (1–2), 93-101.

10. Fanjul-Bolado, P.; Hernández-Santos, D.; Lamas-Ardisana, P. J.; Martín-Pernía, A.; Costa-García, A., Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes. *Electrochimica Acta* **2008**, *53* (10), 3635-3642.

11. Fanjul-Bolado, P.; Queipo, P.; Lamas-Ardisana, P. J.; Costa-García, A., Manufacture and evaluation of carbon nanotube modified screen-printed electrodes as electrochemical tools. *Talanta* **2007**, *74* (3), 427-433.

12. Ochal, P.; Gomez de la Fuente, J. L.; Tsyppkin, M.; Seland, F.; Sunde, S.; Muthuswamy, N.; Rønning, M.; Chen, D.; Garcia, S.; Alayoglu, S.; Eichhorn, B., CO stripping as an electrochemical tool for characterization of Ru@Pt core-shell catalysts. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2011**, *655* (2), 140-146.

13. Luo, X.; Vidal, G. D.; Killard, A. J.; Morrin, A.; Smyth, M. R., Nanocauliflowers: A Nanostructured Polyaniline-Modified Screen-Printed Electrode with a Self-Assembled Polystyrene Template and Its Application in an Amperometric Enzyme Biosensor. *Electroanalysis* **2007**, *19* (7-8), 876-883.

14. Hall, S. B.; Khudaish, E. A.; Hart, A. L., Electrochemical oxidation of hydrogen peroxide at platinum electrodes. Part 1. An adsorption-controlled mechanism. *Electrochimica Acta* **1998**, *43* (5–6), 579-588.

15. Wang, J.; Tian, B.; Nascimento, V. B.; Angnes, L., Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks. *Electrochimica Acta* **1998**, *43* (23), 3459-3465.

16. Giordani, V.; Freunberger, S. A.; Bruce, P. G.; Tarascon, J.-M.; Larcher, D., H₂O₂ Decomposition Reaction as Selecting Tool for Catalysts in Li–O₂ Cells. *Electrochemical and Solid-State Letters* **2010**, *13* (12), A180-A183.

17. Miller, J. C., Miller, J. N., *Statistics for analytical chemistry*. 3rd Ed ed.; Ellis Horwood PTR Prentice Hall: New York, 1993.

18. Bossola, F.; Evangelisti, C.; Allieta, M.; Psaro, R.; Recchia, S.; Dal Santo, V., Well-formed, size-controlled ruthenium nanoparticles active and stable for acetic acid steam reforming. *Applied Catalysis B: Environmental* **2016**, *181*, 599-611.

19. Misra, I.; Parikh, R.; Chakraborty, A.; Suryawanshi, Y. R.; Chakraborty, M., Synthesis of Ruthenium Nanoparticles by Microwave Assisted Solvothermal Technique. In *Materials, Energy and Environment Engineering: Select Proceedings of ICACE 2015*, Mohan B, R.; Srinikethan, G.; Meikap, B. C., Eds. Springer Singapore: Singapore, 2017; pp 51-57.

20. Wu, X.; Narsimhan, G., Characterization of Secondary and Tertiary Conformational Changes of β -Lactoglobulin Adsorbed on Silica Nanoparticle Surfaces. *Langmuir* **2008**, *24* (9), 4989-4998.

21. Rabe, M.; Verdes, D.; Rankl, M.; Artus, G. R. J.; Seeger, S., A Comprehensive Study of Concepts and Phenomena of the Nonspecific Adsorption of β -Lactoglobulin. *ChemPhysChem* **2007**, *8* (6), 862-872.

22. Sassolas, A.; Blum, L. J.; Leca-Bouvier, B. D., Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances* **2012**, *30* (3), 489-511.

23. transduction for applications in wearable electrochemical glucose biosensors., A. A. C. K. M. N. J. A. H. E. S. M. J. C. C. E. o. p. n. d. p. o. h. p.; . Proc. SPIE 9863, S. B. a. P. S. T. X., 98630E (May 13, 2016); doi:10.1117/12.2227204.

24. Bollella, P.; Schulz, C.; Favero, G.; Mazzei, F.; Ludwig, R.; Gorton, L.; Antiochia, R., Green Synthesis and Characterization of Gold and Silver Nanoparticles and their

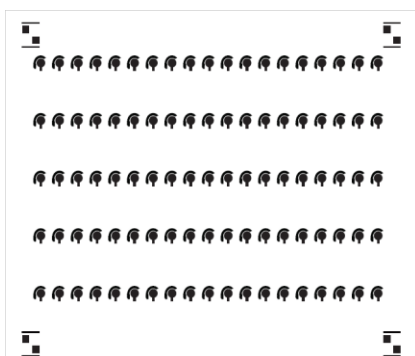
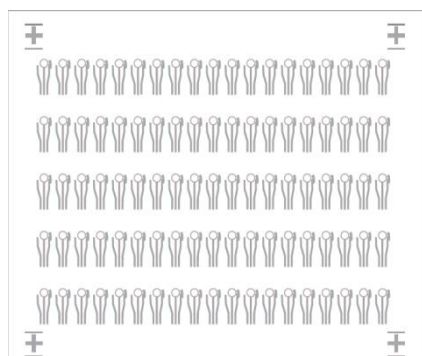
Application for Development of a Third Generation Lactose Biosensor. *Electroanalysis* **2017**, 29 (1), 77-86.

25. Palanisamy, S.; Karuppiah, C.; Chen, S.-M.; Periakaruppan, P., A Highly Sensitive and Selective Enzymatic Biosensor Based on Direct Electrochemistry of Hemoglobin at Zinc Oxide Nanoparticles Modified Activated

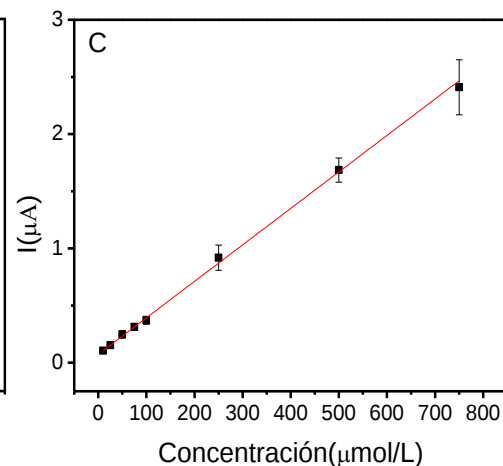
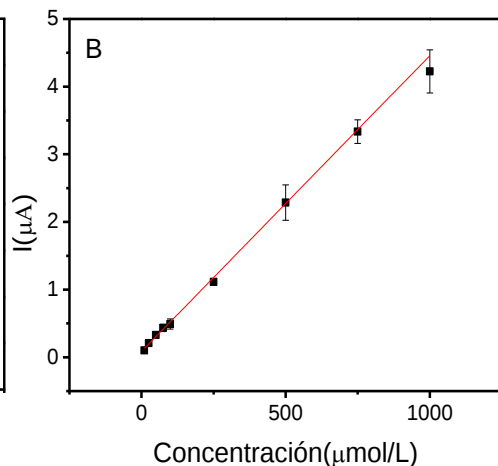
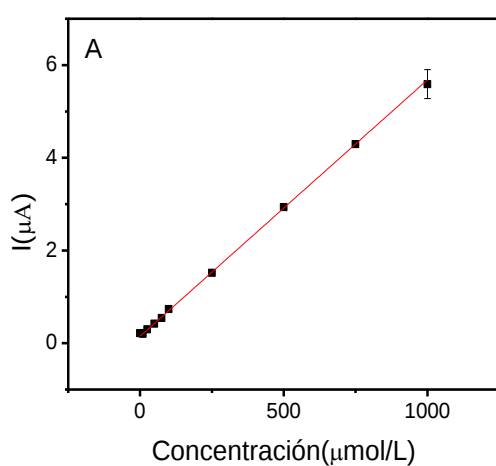
Screen Printed Carbon Electrode. *Electroanalysis* **2014**, 26 (9), 1984-1993.

26. Fernandez, B. S. De. Universidad complutense de Madrid, Desarrollo de electrodos compósitos enzimáticos para la detección y determinación de compuestos fenólicos, 2002.

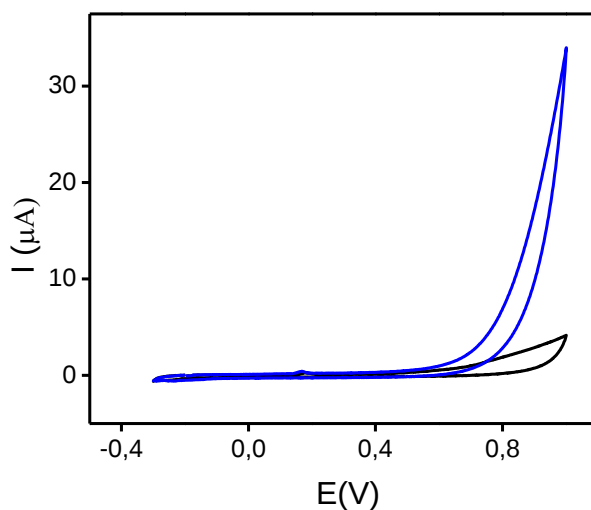
ANEXOS



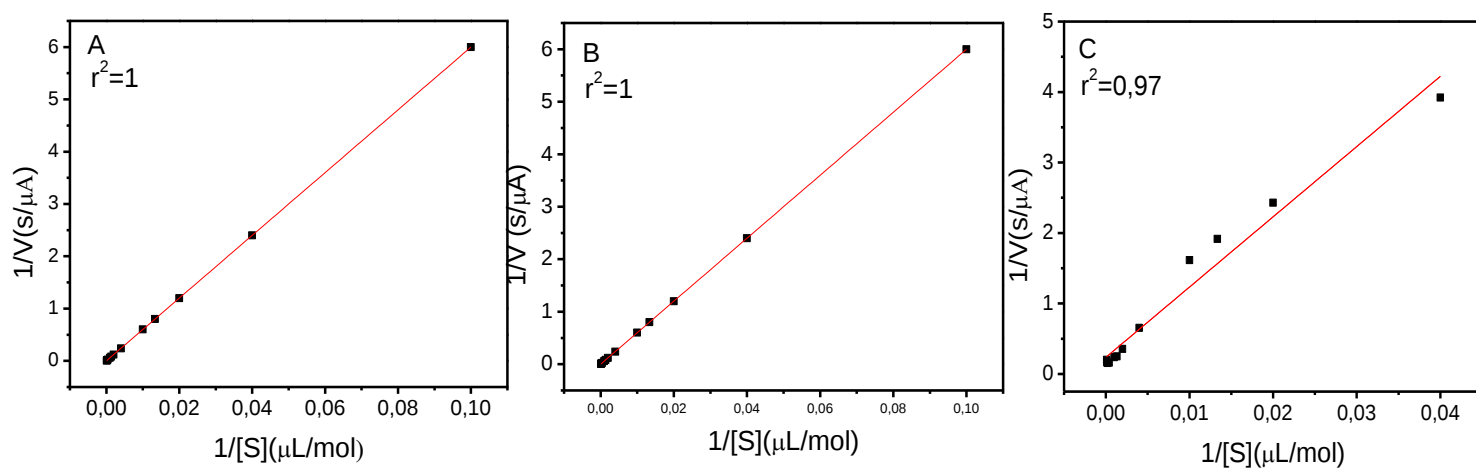
Anexo1. A) Plantilla de la capa de Ag/AgCl utilizada para el electrodo de referencia y los contactos eléctricos, B) Plantilla de la capa de grafito utilizada para el electrodo de trabajo y semireferencia, C) Plantilla de pintura dieléctrica.



Anexo 2. Rango lineal de los biosensores A) Pt/Vulcan, B) PtRu/Vulcan 14-7, C) PtRu/Vulcan 10-10.



Anexo 3. Voltamperometría cíclica de L-lactato de sodio en electrodo modificado con Pt/Vulcan.



Anexo 4. Linealización de Lineweaver-Burke de los biosensores A) Pt/Vulcan, B) PNps/Vulcan 14-7, C) PtRu/Vulcan 10-10

Tabla 5. Comparación de los límites de detección de los biosensores preparados con otros trabajos similares.

Biosensor	LDD (μmol/L)	Autor
Pt/Vulcan	8,55	Londoño-Torres. J; Loaiza. O.
PtRu/Vulcan 14-7	8,76	Londoño-Torres. J; Loaiza. O.
PtRu/Vulcan 10-10	4,05	Londoño-Torres. J; Loaiza. O.
CS/MWCNTsFcMe-HRP/BSA/LOx-SPBGE	22,6	Pérez-Fàbregas
PtNps/GCNF-PEI-GA-LOx-Gly-SPCE	6,9	Loaiza. O., et.al.