



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO
EN ELECTROQUIMICA



**"DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA ALTAMENTE
SELECTIVA DE ÁCIDO ÚRICO EN SUERO
SANGUÍNEO HUMANO MEDIANTE ELECTRODOS DE
CARBÓN VÍTREO MODIFICADOS CON
NANOPARTÍCULAS DE ORO RECUBIERTAS CON
CISTEAMINA Y DENDRÍMEROS DE
POLI(AMIDOAMINA) GENERACIÓN 4.5"**

TESIS PRESENTADA POR:

I.Q. JORGE ALBERTO BANDA ALEMÁN

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN ELECTROQUÍMICA

ENERO, 2015

Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica

REALIZADO POR: I.Q. JORGE ALBERTO BANDA ALEMÁN

DIRIGIDA POR: DR. JUAN MANRIQUEZ ROCHA

SINODALES

Dr. Luis Antonio Ortiz Frade
Presidente

Firma

Dra. Erika Bustos Bustos
Secretario

Firma

Dr. Dra. Silvia Gutiérrez Granados
Vocal

Firma

Dr. Luis Arturo Godínez Mora-Tovar
Vocal

Firma

RESUMEN

En el presente trabajo se modificaron electrodos de carbón vítreo (GCEs) con nanopartículas de oro recubiertas con cisteamina (AuNp@cisteamina) y dendrimeros de poli(amidoamina) generación 4.5 (PAMAM) para la detección amperométrica altamente selectiva de ácido úrico en suero sanguíneo humano. El proceso de modificación de los GCEs se llevó a cabo complementando la metodología reportada en trabajos previos de nuestro grupo de investigación. Este método se compone de tres pasos principales: (a) síntesis química de las AuNp@cisteamina, (b) electroadsorción de las AuNp@cisteamina sobre los GCEs y (c) quimiadsorción de dendrimeros PAMAM sobre el sustrato GCE/AuNp@cisteamina.

El sistema GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM se caracterizó mediante: (a) espectroscopia UV-Vis, para establecer un patrón de crecimiento y tamaño de las AuNp@cisteamina; (b) microscopia RAMAN, para demostrar la interacción covalente entre el azufre de la cisteamina y el oro nanoparticulado; (c) espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), para demostrar que el sistema fue químicamente modificado por dendrimeros y (d) microscopia electrónica de transmisión (TEM), para evaluar composición cristalográfica y tamaño de las AuNp@cisteamina. Así mismo, se demostró vía electroquímica que el sistema GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM presenta un efecto electrocatalítico y de preconcentración para la oxidación de ácido úrico, promovidos por las nanopartículas de oro y la asociación química de los dendrímeros de poli(amidomina). Los electrodos así modificados, fueron utilizados para la detección amperométrica por adición de estándar de muestras de suero sanguíneo humano de pacientes con preeclampsia. Los resultados obtenidos se compararon contra aquellos obtenidos por el método enzimático (ENZ) encontrándose variaciones menores al 10% que no son significativas desde el punto de vista práctico. En este contexto los detectores electroquímicos son una propuesta atractiva por su alta portabilidad, fácil operatividad, menor costo y seguridad.

ABSTRACT

In this work glassy carbon electrodes (GCEs) were modified with gold nanoparticles coated with cysteamine (AuNp@cysteamine) and dendrimers of poly(amidoamine) generation 4.5 (PAMAM) for highly selective amperometric detection of uric acid in human serum. The modification process of the GCEs was carried out complementing the methodology reported in previous papers by our research group. This method consists of three main steps: (a) chemical synthesis of AuNp@cysteamine, (b) electroadsorption of AuNp@cysteamine on GCEs and (c) chemiadsorption of PAMAM dendrimers on GCE/AuNp@cysteamine.

The GCE/AuNp@cysteamine/PAMAM system was characterized by: (a) UV-Vis spectroscopy, to establish a pattern of growth and size of AuNp@cysteamine; (b) Raman spectroscopy, to show covalent interaction between cysteamine sulfur and gold nanoparticles; (c) infrared Fourier transform spectroscopy (FT-IR) to demonstrate that the system was chemically modified by dendrimers and (d) transmission electron microscopy (TEM) to evaluate crystallographic composition and size of the AuNp@cysteamine. In this context it was showed electrochemically that GCE/AuNp@cysteamine/PAMAM presents an electrocatalytic oxidation and preconcentration effect for oxidation of uric acid, promoted by the gold nanoparticles and the chemical association of dendrimers of poly(amidomina). The modified electrodes were used for amperometric detection by standard addition of human serum samples from patients with preeclampsia. The results were compared against those obtained by the enzymatic method (ENZ) and there were founded variations of less than 10% which are not significant from a practical point of view. In this context electrochemical detectors are an attractive proposition for its high portability, easy operation, lower cost and safety.



Este trabajo fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ), bajo la dirección del

Dr. Juan Manríquez Rocha

A G R A D E C I M I E N T O S

Al pueblo trabajador de México, sin su esfuerzo y sacrificio no existirían apoyos económicos para el crecimiento de la ciencia en nuestro país.

Al Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ) por brindarme todas las facilidades para la realización de mi posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la gestión y administración de los recursos financieros del pueblo de México en pro de la ciencia.

A mi director de tesis el Dr. Juan Manríquez Rocha, por confiar en mí para este proyecto, por transmitirme su conocimiento y experiencia.

Al Dr. Alberto Escarpa y sus alumnos Laura, Adrián y Flavio, por permitirme colaborar con su grupo de investigación en la Universidad de Alcalá.

A la Dra Erika Bustos, el Dr. Luis Godínez y el Dr. Luis Frade de CIDETEQ, por sus pertinentes observaciones y consejos respecto a mi trabajo.

A la Dra. Selene Sepúlveda Guzmán del CIDIIT, por facilitar la obtención de imágenes SEM y TEM.

Al Dr. Héctor Flores Herrera del Instituto Nacional De Perinatología, por facilitar las muestras de suero sanguíneo.

A la Dra. Perla Fabiola Méndez Herrera por su ayuda en el análisis de los resultados obtenidos en TEM.

A mis amigos, Mayra, Karina, Mónica, Francisco, Abraham y Cristian; por hacer mi estancia en Querétaro más agradable, por los momentos y consejos compartidos.

A mis amigos Mario, Abraham, Angel, Jesús Abraham, Jorge, por las experiencias que hemos compartido, por ayudar a mantenerme firme y digno.

A Nicolás, Nelson y Benjamín, por cuidar a mis papas cuando estoy lejos de casa.

A mi sobrina Luna, por motivarme a conseguir un futuro mejor.

A mis hermanos Argenis y Alejandra, por todo su cariño y apoyo, por formar parte de mi vida.

A mi abuelita Bertha, por ser como otra madre para mí, por ayudar a mis padres en mi crianza, por todo su amor y comprensión.

A Rosa, por acompañarme durante esta estancia en Querétaro, por todas las experiencias compartidas, por su comprensión, amistad y amor.

A las personas más importantes en mi vida, mis padres Rita y Raúl, por la familia que decidieron formar y de la cual orgullosamente formo parte, por todos los sacrificios que han hecho para cubrir mis necesidades, por los valores que me inculcaron, por no dejar que me diera por vencido, por su tiempo, por su amor.

CONTENIDO

1. Introducción.....	1
Sección 1: Marco Teórico.....	2
1. El origen del ácido úrico.....	2
1.1 Las biomoléculas.....	2
1.2 Principales biomoléculas.....	2
1.3 Nucleótidos.....	3
1.4 Los nucleótidos de purina y su degradación a ácido úrico.....	4
2. Acumulación del ácido úrico: hiperuricemia.....	6
2.1 Eliminación del ácido úrico.....	6
2.2 Hiperuricemia.....	7
3. El ácido úrico y su papel como biomarcador en la preeclampsia.....	8
4. Métodos electroquímicos para la detección de analitos.....	10
4.1 Detectores electroquímicos.....	11
4.1.1 Celda electroquímica para electroanálisis.....	12
4.1.2 Tipos de detectores electroquímicos.....	13
4.1.2.1 Detectores Amperométricos.....	13
4.1.2.2 Detectores Potenciométricos.....	14
4.1.2.3 Detectores Conductimétricos.....	14
4.2 Técnicas usadas para la detección electroquímica.....	14
4.2.1 Voltamperometría cíclica.....	15
4.2.2 Cronoamperometría.....	16
4.2.3 Voltamperometría de pulso diferencial.....	17
4.3 Materiales de los electrodos de trabajo.....	18
4.3.1 Electrodos de carbono.....	19
4.3.1.1 Electrodos de carbón vítreo.....	19

4.3.2 Electroodos químicamente modificados.....	22
4.3.2.1. Electrocatálisis	24
4.3.2.2. Preconcentración.	24
4.3.2.3 Nanopartículas como modificador de electrodo.	24
5. Dendrimeros para la funcionalización de electrodos.....	25
Sección 2: Antecedentes	28
1. La medición habitual de ácido úrico.....	28
2. Detectores y biosensores electroquímicos para la detección de ácido úrico..	29
Sección 3: Propuesta del proyecto	32
1. Objetivos	32
1.1 Objetivo General.	32
1.1.1 Objetivos Específicos.....	32
2. Justificación.....	32
3. Hipótesis	33
Sección 4: Desarrollo experimental	34
1. Modificación de GCEs con nanopartículas de oro recubiertas con cisteamina (AuNp@cisteamina) y con dendrimeros PAMAM G 4.5.....	34
1.1 Preparación de las nanopartículas de oro.	34
1.2 Electrodeposición de las AuNp sobre GCEs.....	35
1.3 Quimiadsorción de dendrimeros.....	36
Sección 5: Resultados	37
1. Modificación de GCEs con nanopartículas de oro recubiertas con cisteamina (AuNp@cisteamina) y con dendrimeros PAMAM G 4.5.....	37
2. Evaluación de muestras sintéticas de ácido úrico para construcción de curva de calibración.	42
2.1 GCEs modificados con AuNp@cisteamina/PAMAM.....	42
2.2 GCE desnudo.	43
2.3 GCE modificado con nanopartículas de oro vía electrodeposito.....	43

3. GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM vs. GCE/AuP	45
4. Evaluación de muestras de suero sanguíneo con el sistema GCE/ AuNp@cisteamina/PAMAM.....	46
5. Método de adición de estándar del GCE/AuNp@cysteamina/PAMAM.	49
Sección 6: Conclusiones.	52
Sección 7: Perspectivas.	53
Anexo 1. Desarrollo experimental y matemático para la determinación de la concentración de ácido úrico mediante el método electroquímico de adición de estándar.	59
Anexo 2. Estimación del factor de rugosidad para electrodos de carbón vítreo.	64
Anexo 3. Artículo Publicado.....	67
Referencias.	¡Error! Marcador no definido.

Índice de figuras

Figura 1. Purinas principales que forman nucleótidos.....	4
Figura 2. Nucleótidos de purina que al catabolizar forman ácido úrico.....	4
Figura 3. Catabolismo de los nucleótidos de purina.....	5
Figura 4. Formula química desarrollada del ácido úrico.....	6
Figura 5. Elementos y componentes típicos de los detectores electroquímicos.....	11
Figura 6. Arreglo típico de una celda de tres electrodos.....	12
Figura 7. Perturbación potencial-tiempo en un experimento de voltamperometría cíclica.	15
Figura 8. Voltamperograma cíclico típico para un proceso reversible $O + ne^- \leftrightarrow R$	16
Figura 9. (a) Representación esquemática del cambio de potencial en CA, (b) variación de corriente resultante en función del tiempo.....	16
Figura 10. Señal de excitación para la voltamperometría de pulso diferencial.....	17
Figura 11. Voltamperograma de pulso diferencial para una mezcla de 1 mg/L de iones de cadmio y plomo, electrolito HNO_3 0.1M. Tomada y modificada de [25].	18
Figura 12. Esquema del modelo estructural del carbón vítreo más aceptado. El tamaño de cristalito para las microfibrillas orientadas al azar es sólo L_a (50Å) x L_c (15Å).....	21
Figura 13. Representación esquemática de varias rutas para la modificación de electrodos.....	23
Figura 14. Respuestas voltamperometricas de CMEs ITO/AuNp para diversos tamaños y formas. Tomada y modificada de [52].	25
Figura 15. Esquema representativo de un dendrímero generación 3.....	26
Figura 16. Estructura de un dendrímero PAMAM de terminación aminada generación 3.	27

Figura 17. Esquematización de la interacción del 2-naftol como función del pH predominante en medio acuoso, tomada y modificada de [58].....	27
Figura 18. CV de AU 10 uM en (a) GCE desnudo (b)GCE/poly Evans Blue. Velocidad de barrido 100 mV/s. Tomada de [45].....	30
Figura 19. Molécula del clorhidrato de cisteamina	34
Figura 20. Esquematización de la síntesis de nanopartículas de oro en la presencia de clorhidrato de cisteamina.	34
Figura 21. Mecanismo propuesto para explicar la electroadsorción de AuNp@cisteamina en GCEs. Tomada de [68].	35
Figura 22. Espectro de absorción UV-Vis obtenido para agua deionizada conteniendo AuNp@cisteamina a 25°C.	37
Figura 23. Respuesta voltamperometrica obtenida para (A) GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM y (B) GCE, en 0.5 M H ₂ SO ₄ a 40 mV s ⁻¹	38
Figura 24. Espectros Raman de cisteamina pura (i) y GCE/AuNp@cisteamina (ii). (G) y (D) son las vibraciones referidas a los enlaces sp ² del carbono del GCE.	39
Figura 25. Espectro FT-IR obtenido para GCE (i); GCE/AuNp@cisteamina (ii) y GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM (iii) a 25°C.	40
Figura 26. Imagen TEM y el patrón de difracción de electrones de las AuNp@cisteamina. (izq.) Imagen TEM que muestra la morfología de los cristales de oro. (der) patrón de difracción de electrones.....	40
Figura 27. Histograma que muestra la distribución del tamaño de partícula de las AuNps@cisteamina	41
Figura 28. Respuestas voltamperometricas obtenidas para la oxidación de AU a 0.58V en GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM en PBS-pH2 (I=0.1). Las concentraciones de AU fueron incrementadas sucesivamente de la siguiente manera: 0, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, 0.20, 0.22 and 0.25 mg·dL ⁻¹ . Todos los experimentos se llevaron a cabo a 40mV·s ⁻¹ y 25°C.	42

Figura 29. Respuestas voltamperometricas obtenidas para GCE en PBS-pH2 (I=0.1) + Au a (i) 0, (ii) 0.03 y (iii) 0.25mg·dL ⁻¹	43
Figura 30. CV obtenido para el electrodepósito de AuP en GCEs. Los picos observados a 0.42 and 1.20V corresponden al depósito y redisolución de AuPs respectivamente. La velocidad de barrido es de 100mV·s ⁻¹	44
Figura 31 Respuestas voltamperometricas obtenidas a 0.75V con GCE/AuP en PBS-pH2 (I=0.1). Las concentraciones de AU fueron incrementadas sucesivamente de la siguiente manera: 0, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, 0.20, 0.22 and 0.25 mg·dL ⁻¹ . Todos los experimentos se llevaron a cabo a 40mV·s ⁻¹ y 25°C.	45
Figura 32. Comparación entre corrientes de oxidación de AU obtenidas en GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM (O) y GCE/AuP (Δ) en PBS-pH2 (I=0.1).	46
Figura 33. Respuestas voltamperometricas obtenidas para la oxidación de muestras de AU a 0.62 V en GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM en PBS-pH2 (I=0.1). Todos los experimentos se llevaron a cabo a 40mV·s ⁻¹ y 25°C.	47
Figura 34. (A) En GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM en PBS-pH2 (I=0.1), se aplicaron 0.64 V y las concentraciones de AU fueron adicionadas sucesivamente de la siguiente manera: 0, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, 0.20, 0.22 y 0.25 mg·dL ⁻¹ , (B) Curva de calibración del sistema GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM.	48
Figura 35. Respuestas amperometricas obtenidas para la oxidación de 3 muestras de suero sanguíneo con concentraciones distintas. Las corrientes fueron medidas en 0.64V vs (Ag AgCl 3M NaCl) en GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM en PBS-pH2 (I=0.1). Todos los experimentos se llevaron a cabo a 25°C.	49
Figura 36. Comparación entre corrientes de oxidación de AU obtenidas por adición de estándar (O) y amperometría (Δ) en PBS-pH2 (I=0.1).	50
Figura 37. Potenciostato portable marca Ivium, modelo pocketstat, tamaño: 115.2 x 58.5 x 12.5mm, peso: 140 g, tamaño: 115.2 x 58.5 x 12.5mm, ventana de potencial: ±4V / ±10mA, impedancia de entrada ≥ 1TΩ, resolución ± 10mV.	50

Figura 38. CVs obtenidos para la electrodeposición de AgNp en electrodos de gota de carbón. Barrido de potencial igual a $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$	54
Figura 39. Micrografías SEM de sistemas (A)SPEC/AgNp y (B)SPEC	55
Figura 40. Respuestas obtenidas para la oxidación galactosa 1-fosfato (A), UDP (B) y de galactosa (C).	55
Figura 41. A) Esquema de potenciales y tiempos involucrados en la técnica de doble-pulso de potencial, y B) voltamperograma típico para un electrodepósito metálico donde se remarcan los potenciales necesarios en la técnica de doble-pulso de potencial. Se muestran tres ciclos de barrido de potencial, tomada y modificada de [77].....	56
Figura 42. Relación espacial del crecimiento de núcleos metálicos, tomada y modificada de [77].....	57
Figura 43. Efecto del potencial sobre la dispersión de tamaños de partícula metálicas como función del tiempo. La situación ideal para un crecimiento sin apareamiento se remarca con el cuadro de líneas más gruesas [78].....	58
Figura 44. Elementos del arreglo experimental para evaluación de AU en muestras de suero sanguíneo: (a) Celda electroquímica marca Bas, (b) Agitador magnético recubierto de teflon.	59
Figura 45. Amperograma obtenido en el análisis de una muestra de suero sanguíneo por adición de estándar, donde: (A) Zona de estabilización de la corriente del blanco (capa de difusión), (B) Adición de la muestra problema y (C) Adiciones de estándar. .	60
Figura 46. Representación gráfica de la recta de calibrado del método de adición de estándar. La concentración de la disolución problema se puede calcular por extrapolación como se denota por la línea punteada.	62
Figura 47. Datos del método de adición estándar para la determinación de AU en una muestra de suero sanguíneo.	63

Figura 48. Espectro EIS obtenido para un GCE poroso, inmerso en NaF 0.9N a 25°C, donde la línea continua es la respuesta ajustada al circuito equivalente mostrado en la Figura 49A. 64

Figura 49. (A) Circuito equivalente ajustado al espectro experimental mostrado en la figura 48 basado en el esquema (B), que representa la estructura más aceptada del GCE poroso, donde el tamaño de cristalito para las microfibrillas orientadas aleatoriamente es solo $L_a(50\text{Å}) \times L_c(15\text{Å})$ [80] con un espacio intercapa de aproximadamente 3.5 Å, sugiriendo que los aniones F^- (Radio iónico de 1.5 Å [81]) pueden ser adsorbido en la región intercapa. 65

Índice de tablas

Tabla 1. Clases principales de biomoléculas.....	3
Tabla 2. Niveles plasmáticos de ácido úrico, tomada y modificada de [5]	7
Tabla 3. Casusas de hiperuricemia.....	8
Tabla 4. Algunas propiedades físicas del carbón vítreo	20
Tabla 5. Tiempos de reacción de materiales grafíticos a 800 ± 5 °C en $N_2:O_2 = 81:19$	20
Tabla 6. Análisis de los patrones de difracción de las AuNps@cisteamina.....	41
Tabla 7. Comparación de concentraciones de AU medidas por método enzimático y electroquímico.	46
Tabla 8. Comparación de concentraciones de AU medidas por método enzimático y electroquímico.	48
Tabla 9. Comparación de concentraciones de AU de pacientes con PE, medidas por método enzimático y electroquímico de adición de estándar.	51
Tabla 10. Componentes eléctricos del espectro EIS (Figura 48) ajustado al circuito equivalente mostrado en la Figura 49. Resistencia promedio obtenida del parámetro (a) r_1 , (b) r_2 , descrito por el elemento DX1, (c) capacitancia promedio obtenida del parámetro q_2 descrito por el elemento DX1.....	65

Índice de reacciones

Reacción 1. Oxidación de AU a alantoína y peróxido de hidrógeno (25 °C, Buffer de fosfatos pH 7.4).	28
Reacción 2. Formación de quinonaimina roja (25 °C, Buffer de fosfatos pH 7.4).....	28
Reacción 3. Mecanismo propuesto para la oxidación de ácido úrico.	29
Reacción 4. Mecanismo de reacción que explica la electro-formación de AuO.....	37

ABREVIATURAS

AA	Ácido ascórbico
ATP	Adenosina trifosfato
AU	Ácido Úrico
AuNps	Nanopartículas de oro
CA	Cronoamperometría
CE	Electrodo auxiliar
CTP	Con trabajo de parto
CV	Voltamperometría cíclica
DEQ	Detectores electroquímicos
DPA	Dopamina
DPV	Voltamperometría de pulso diferencial
EC	Eclampsia
EDC	Etilcarbodimida
ENZ	Enzimático
EQ	Electroquímico
FTIR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
GC	Carbón vítreo
GCEs	Electrodos de carbón vítreo
PAMAM	Dendrimeros de poliamidoamina
PE	Preeclampsia
RE	Electrodo de referencia
SEM	Microscopia electrónica de barrido
STP	Sin trabajo de parto
TEM	Microscopia electrónica de transmisión

WE

Electrodo de trabajo

XPS

Espectroscopia fotoelectrónica de rayos x

1. Introducción

Los trastornos hipertensivos del embarazo son causa importante de morbilidad grave, discapacidad crónica y mortalidad materna y perinatal en la población mundial. En países con economías emergentes tales como los de América Latina y el Caribe los trastornos hipertensivos constituyen la principal causa de muerte materna (> 25%) [7]. En este contexto, la Preeclampsia (PE) es el síndrome con mayor ocurrencia en México (5 a 10% de los embarazos) [8]. Se han considerado diversas teorías sobre su origen, pero ninguna explica los diversos eventos fisiopatológicos que la caracterizan.

Para la comunidad médica, es indispensable el análisis del ácido úrico (AU), ya que este metabolito juega un papel importante en el diagnóstico y control de los principales padecimientos hipertensivos, por lo que tener una medición rápida y precisa es definitivamente útil.

La cuantificación de AU en suero sanguíneo es efectuada rutinariamente mediante el "método enzimático-colorimétrico" que requiere un control estricto de la conservación del kit enzimático (2-8°C, obscuridad, 1 mes máximo) y del suero sanguíneo (2-8°C, 3-5 días máximo) [5]. Esta situación pone de manifiesto la dificultad de efectuar el examen de AU en comunidades aisladas, donde los servicios de infraestructura técnica pueden ser determinantes en la toma y análisis de muestras.

En CIDETEQ se han estado desarrollando electrodos de carbón vítreo modificados a base de nanopartículas de oro y dendrímeros que han permitido analizar AU en muestras de suero sanguíneo de pacientes con hiperuricemia e hipouricemia (límites de detección y cuantificación de 1.7×10^{-4} y 5.8×10^{-4} mg/dL respectivamente), estas mediciones no muestran una variación significativa respecto a los controles elaborados por el método enzimático colorimétrico.

En este proyecto se realizaron depósitos electroquímicos de oro nanoparticulado sobre electrodos de carbón vítreo, en dicho sistema se promovió la adsorción de dendrímeros de poli(amidoamina) generación 4.5. Este electrodo modificado se utilizó en el desarrollo de un detector amperométrico que evaluó la concentración de AU de manera directa y selectiva en suero sanguíneo de pacientes con PE.

Sección 1: Marco Teórico

1. El origen del ácido úrico.

El ácido úrico (AU) es el catabolito terminal del metabolismo de las purinas en los humanos. A continuación se describen las principales biomoléculas que operan en el metabolismo humano, para dar pie a la explicación del origen de las purinas y su mecanismo de degradación como ruta de origen del AU en suero sanguíneo.

1.1 Las biomoléculas.

La gran mayoría de las moléculas en los seres vivos son orgánicas y están formadas principalmente por seis elementos: carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre, y contienen cantidades mínimas de otros elementos metálicos y otros no metálicos. Los átomos de estos elementos tienen la notable capacidad de formar enlaces covalentes estables a través de los cuales, se consigue la formación de diversas moléculas orgánicas de alta complejidad estructural que incluso se conocen como macromoléculas.

Las biomoléculas se derivan del tipo más simple de moléculas orgánicas, los hidrocarburos. Los hidrocarburos son moléculas que contienen carbono e hidrógeno y son hidrófobas. Todas las demás biomoléculas se forman uniendo otros átomos o grupos de átomos al esqueleto de un hidrocarburo. Las propiedades químicas de estas moléculas derivadas están determinadas por la disposición específica de los átomos denominados grupos funcionales.

La mayoría de las biomoléculas contienen más de un grupo funcional. Por ejemplo, moléculas sencillas de azúcar tienen varios grupos hidroxilo y un grupo aldehído. Los aminoácidos, que son los bloques de construcción de las proteínas, tienen un grupo amino y un grupo carboxilo. Las propiedades químicas de cada grupo funcional contribuyen al comportamiento de las moléculas que lo contienen [1].

1.2 Principales biomoléculas.

Las células contienen cuatro familias de biomoléculas: aminoácidos, azúcares, ácidos grasos y nucleótidos (Tabla 1). Los miembros de cada grupo desempeñan varias funciones. En primer lugar, se utilizan en la síntesis de moléculas mayores, muchas de las cuales son polímeros. Por ejemplo, las proteínas, determinados hidratos

de carbono y los ácidos nucleicos son polímeros formados por aminoácidos, azúcares y nucleótidos, respectivamente. Los ácidos grasos son componentes de varias clases de moléculas de lípidos (insolubles en agua). En segundo lugar, algunas moléculas tienen funciones biológicas especiales. Por ejemplo, el nucleótido adenosina trifosfato (ATP, por sus siglas en inglés que significan adenosine triphosphate) opera como reserva celular de energía química. Finalmente, muchas moléculas orgánicas pequeñas participan en las rutas de reacciones metabólicas [1]. En la siguiente sección se describen a detalle los nucleótidos que son de interés en el estudio del origen del ácido úrico.

Biomoléculas	Polímero	Funciones Generales
Aminoácidos	Proteínas	Catálisis y elementos estructurales
Azúcares	Hidratos de carbono	Fuentes energéticas y elementos estructurales
Ácidos grasos	N.A.	Fuentes energéticas y elementos estructurales de las moléculas lipídicas complejas
Nucleótidos	DNA RNA	Información genética Síntesis de proteínas

Tabla 1. Clases principales de biomoléculas.

1.3 Nucleótidos.

Los nucleótidos se conforman de tres componentes: un azúcar de cinco carbonos (bien ribosa o desoxirribosa), una base nitrogenada, y uno o varios grupos fosfato. Las bases de los nucleótidos son anillos aromáticos heterocíclicos con varios sustituyentes. Hay dos clases de bases: las purinas bicíclicas y las pirimidinas monocíclicas.

Los nucleótidos participan en una gran variedad de reacciones de biosíntesis y de generación de energía. Por ejemplo, una proporción sustancial de la energía que se obtiene de los alimentos se utiliza para formar los enlaces fosfato de energía elevada de la adenosina trifosfato (ATP). Sin embargo, la función más importante de los nucleótidos es actuar como bloques de construcción de los ácidos nucleicos [1].

1.4 Los nucleótidos de purina y su degradación a ácido úrico.

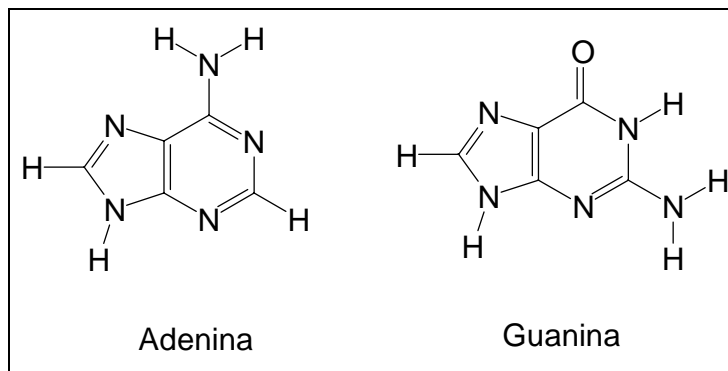


Figura 1. Purinas principales que forman nucleótidos.

Las purinas están representadas en el organismo por la adenina y la guanina (Figura 1), su precursor la inosina y derivados menores que se encuentran en los ácidos nucleicos. Las purinas pueden provenir de los alimentos, de la degradación de los ácidos nucleicos endógenos o pueden sintetizarse *de novo* [2]. La síntesis de las purinas en un complejo mecanismo de reacciones enzimáticas que no son objeto de estudio en este proyecto, sin embargo su camino a la degradación si es sujeto de mención, ya que en el ser humano las purinas se degradan a AU.

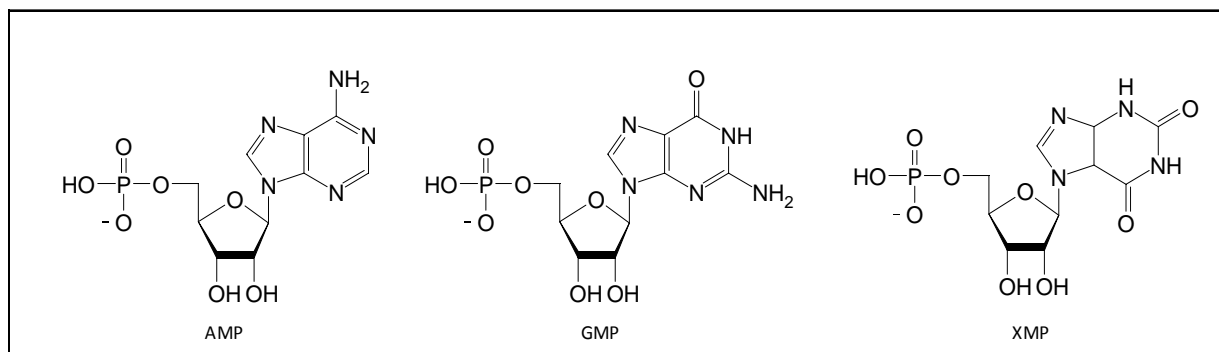


Figura 2. Nucleótidos de purina que al catabolizar forman ácido úrico.

En la mayoría de los seres vivos, los nucleótidos de purina se están degradando constantemente. En los animales, la degradación se produce debido a la regeneración normal de los ácidos nucleicos y los nucleótidos, y a la digestión de los ácidos nucleicos del alimento. No obstante este paso catabólico es mucho más complejo de lo que parece.

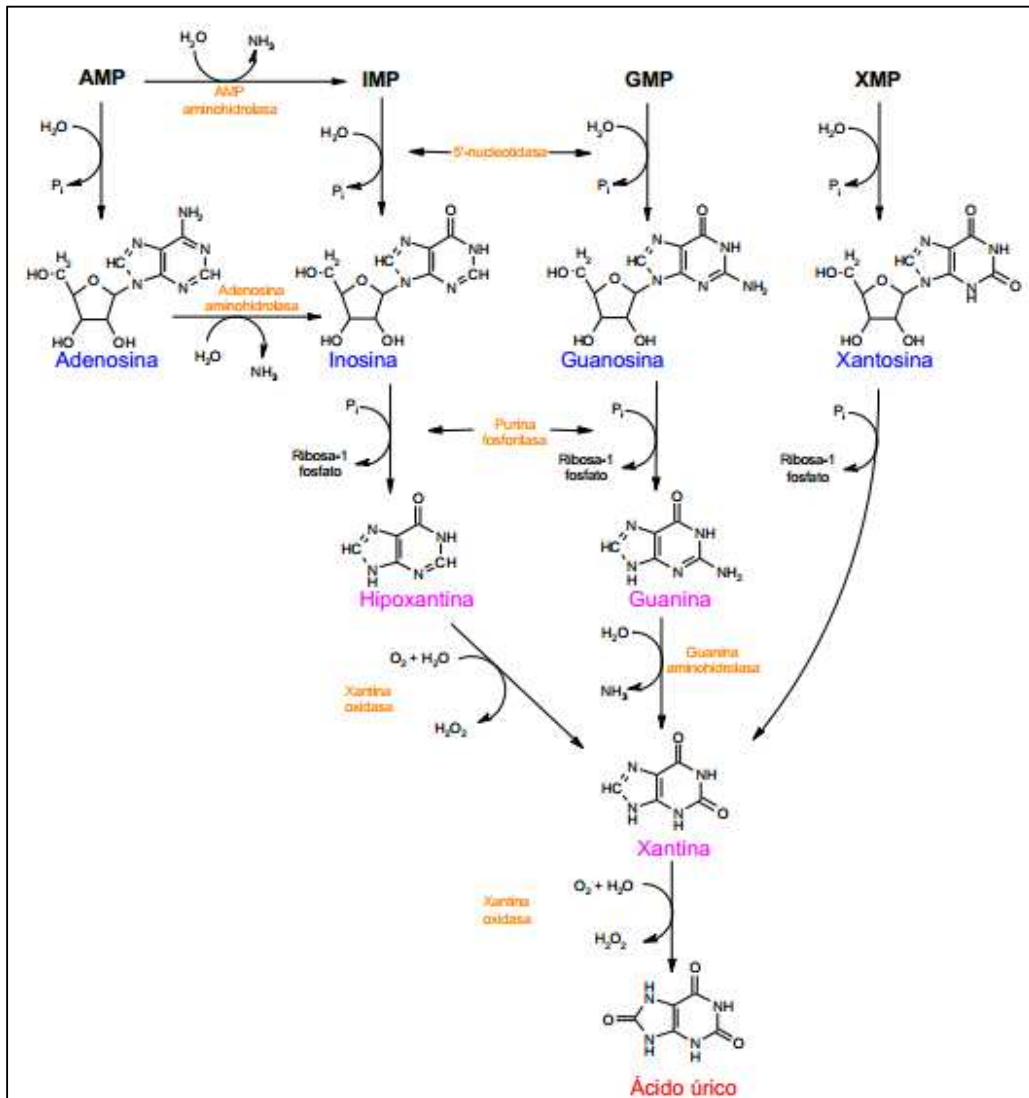


Figura 3. Catabolismo de los nucleótidos de purina.

La degradación de las purinas, se promueve por el catabolismo de los nucleótidos Adenosina monofosfato (AMP, por sus siglas en ingles que significan adenosine monophosphate), Guanosina monofosfato (GMP, por sus siglas en ingles que significan guanosine monophosphate) y Xantosina monofosfato (XMP, por sus siglas en ingles que significan xanthosine monophosphate) (Figura 2).

En la figura 3 se esquematizan las variaciones de las rutas específicas que utilizan los diferentes organismos o tejidos para degradar el AMP, GMP y XMP. Aunque los nucleótidos de purinas se sintetizan y degradan en todos los tejidos, el AU se produce solo en tejidos que contengan xantina oxidasa, especialmente hígado e intestino delgado [4].

2. Acumulación del ácido úrico: hiperuricemia.

En este apartado se explicaran los mecanismos biológicos de secreción del ácido úrico y las alteraciones del mismo que desencadenan diversos padecimientos de salud en los seres humanos.

2.1 Eliminación del ácido úrico

El AU (Figura 4), es un ácido débil ($pK_{a1}= 5.4$, $pK_{a2}= 9.8$) que a pH fisiológico se encuentra disociado en aproximadamente un 98%, por lo que la mayoría se encuentra en forma de ion urato; el termino urato, utilizado individualmente, hace referencia al par ácido-base de ácido úrico/ion urato. En el plasma sanguíneo, donde el ion Na^+ es el catión predominante, el urato se encuentra en forma de urato monosódico [3]. Esta sal tiene escasa solubilidad en agua, y estudios realizados *in vitro* han demostrado que se encuentra en disolución saturada a concentraciones ligeramente superiores a las fisiológicas [2]. La existencia de una concentración de urato en plasma sanguíneo por encima del límite de saturación puede ser explicada por su unión a proteínas plasmáticas u otras moléculas que aumentan su solubilidad.

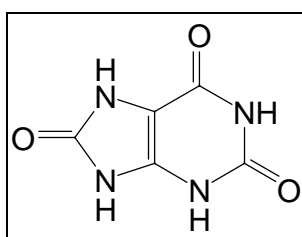


Figura 4. Formula química desarrollada del ácido úrico.

La solubilidad del urato monosódico varía en función de la temperatura y el pH de los líquidos en los que se encuentra en disolución. Así se observa que la solubilidad de esta sal disminuye a medida que desciende la temperatura corporal (lo que explica la tendencia de los depósitos de cristales de urato monosódico a localizarse en las articulaciones periféricas en los casos de gota artrítica, por ejemplo) y aumenta cuando el pH es alcalino.

La producción diaria de urato es aproximadamente de 5 mM en un individuo adulto. El urato es eliminado del organismo siguiendo dos vías, la renal o intestinal. La vía renal es la más importante, ya que supone la eliminación del 60 a 80% del urato producido diariamente en el organismo.

El urato es totalmente filtrado por los glomérulos (la fracción unida a proteína puede considerarse despreciable) y casi totalmente reabsorbido en los túbulos contorneados proximales. En las porciones distales de las nefronas tienen lugar el mecanismo de secreción y reabsorción (secreción de la porción distal del túbulo contorneado proximal y reabsorción en el túbulo distal), de forma que finalmente se elimina un 10% del urato que inicialmente es filtrado [4].

En la orina el AU es aún más soluble (aunque puede encontrarse también como ion urato) debido a la presencia de urea y mucopolisacáridos y a su pH ácido. Así, la concentración urinaria de ácido úrico aumenta paralelamente a la acidez de la orina.

Suero Sanguineo	Min (mg/dL)	Max (mg/dL)
Mujeres	2.5	6.8
Hombres	3.6	7.7

Tabla 2. Niveles plasmáticos de ácido úrico, tomada y modificada de [5]

La eliminación intestinal de urato (uricolisis), es llevada a cabo por las bacterias intestinales donde se metaboliza a CO_2 y iones NH_4^+ . Así pues, la relación entre la producción y la excreción es la que finalmente determina los niveles de uratos en sangre (Tabla 2 [5]).

2.2 Hiperuricemia.

Según criterios bioquímicos, epidemiológicos y clínicos, la hiperuricemia se define como la concentración sérica o plasmática de AU por encima del límite fisiológico (concentraciones sanguíneas elevadas de ácido úrico superiores a 7 mg/dL en los hombres y 6 mg/dL en las mujeres) [1].

Este problema se origina por causas muy variadas (Tabla 3 [4]), pero tres son las principales:

1. Insuficiencias renales causadas por alteraciones fisiológicas, patológicas y farmacológicas pueden alterar la eliminación renal de AU interfiriendo en las distintas fases y mecanismos que intervienen en este proceso.
2. Alteración directa al metabolismo de las purinas.

3. Consecuencia de la existencia de otras enfermedades que ocurren simultáneamente con un aumento sostenido de la concentración de ácido úrico en suero sanguíneo.

La existencia de hiperuricemia es uno de los factores de riesgo más importantes en la detección de trastornos a la salud. Estudios en personas con hiperuricemia asintomática han demostrado una notable asociación con la hipertensión, la obesidad, síndromes metabólicos como la diabetes mellitus y enfermedades renales y cardiovasculares [6].

Causas de Hiperuricemia		
Por sobreproducción de uratos	Por disminución de la excreción de ácido úrico	Yatrogénica (por fármacos)
Idiopática	Idiopática	Salicilatos en dosis bajas
Déficit de hipoxantina-fosforibositransferasa	Insuficiencia renal	Diuréticos
Procesos hemolíticos	Diabetes	Alcohol
Procesos linfoproliferativos	Hipertensión	Piracinamida
Procesos mieloproliferativos	Hipotiroidismo	Nicotinamida
Rabdomiolisis	Síndrome de Bartter	Etambutol
Ejercicio Exagerado		Acido nicotínico
Alcohol		Ciclosporina
Diera excesiva en purinas		
Obesidad		

Tabla 3. Casusas de hiperuricemia.

Al respecto se pueden mencionar diversos padecimientos, por ejemplo, *la gota artrítica*. El ataque de *gota* se produce como una respuesta inflamatoria a los cristales de urato monosódico que se acumulan en los tejidos de las articulaciones. Sus principales causas son fallos en la regulación de la síntesis de purinas en el organismo.

La hiperuricemia también está asociada con trastornos hipertensivos que se presentan en el embarazo, siendo la preeclampsia (PE) un padecimiento de especial importancia por los altos índices de mortalidad de las pacientes que la presentan [7].

3. El ácido úrico y su papel como biomarcador en la preeclampsia.

Los trastornos hipertensivos del embarazo son causa importante de morbilidad grave, discapacidad crónica y mortalidad materna y perinatal a nivel mundial. En países con economías emergentes como los de América Latina y el Caribe estos

padecimientos constituyen la principal causa de muerte materna (> 25%) [7]. La Preeclampsia (PE) es el síndrome hipertensivo con mayor ocurrencia en México (5 a 10% de los embarazos) [8].

De acuerdo con el Lineamiento Técnico para la Prevención, Diagnóstico y Manejo de la Preeclampsia/Eclampsia [8], la PE se define como un síndrome multisistémico de severidad variable, específico del embarazo, caracterizado por una reducción de la perfusión sistémica generada por vasoespasmo y activación de los sistemas de coagulación. Se presenta después de la semana 20 de la gestación, durante el parto o en las primeras 6 semanas después de éste. El cuadro clínico se caracteriza por hipertensión arterial alta (140/90 mmHg) acompañada de proteinuria (> 300 mg/24 h) y es frecuente que además se presente cefalea, acufenos, fosfenos, edema y/o dolor abdominal. Se le conoce como eclampsia (EC) cuando además, las pacientes con preeclampsia presentan convulsiones o estado de coma en ausencia de otras causas”.

Se han considerado diversas teorías sobre su origen, pero ninguna explica los diversos eventos fisiopatológicos que la caracterizan. Los factores hereditarios y adquiridos, familiares, ambientales, inmunológicos e individuales parecen interactuar de diversas maneras para que los síntomas de la PE aparezcan [9].

En las pacientes con PE se han estudiado diversos biomarcadores con el propósito de elaborar un diagnóstico temprano y tratamiento oportuno, establecer el diagnóstico diferencial con otros estados hipertensivos, el pronóstico de las complicaciones materno-fetales y determinar su papel etiológico y patogénico. Uno de los biomarcadores más estudiado es la concentración de AU en el suero sanguíneo.

En embarazos sin complicaciones, la concentración de AU en el embarazo temprano suele disminuir de un 25 a 35% (3.8 mg/dL) [9,10], esto se debe a una elevación en la depuración renal, al aumento de la tasa de filtración glomerular y a cambios en su tasa de producción. Más adelante en el embarazo, los niveles séricos de AU aumentan, acercándose a los valores normales de una paciente que no está embarazada (4.65 mg/dL) [11].

La hiperuricemia en solitario o en acción conjunta con otros biomarcadores del síndrome metabólico que coexisten alrededor de la vigésima octava semana de gestación se relacionan con aumento del riesgo para PE. La explicación más aceptada para la hiperuricemia en PE es el incremento en la reabsorción y la disminución de la excreción de AU en los túbulos proximales, aunque otros sugieren que el aumento de ácido úrico es un marcador de la elevada actividad de la xantina oxidasa [12].

Bellomo y col. [13] realizaron el estudio y seguimiento de las concentraciones de AU en pacientes con alto riesgo a presentar preeclampsia (primigrávidas, después de 20 semanas de gestación, hipertensión y ausencia de proteinuria). En una población de 163 pacientes el 45% desarrolló PE y un 26% entregó infantes con corta edad gestacional. Los resultados fueron contundentes, ya que la medición de AU confirió de 8 a 9 riesgos de PE con 1.6 a 1.7 riesgos de infantes con prematurez; indicando que el examen tuvo un alto valor predictivo debido a que la enfermedad fue común para la población estudiada, mientras que el falso positivo fue relativamente poco frecuente en clara concordancia con el Teorema de Bayes. Este estudio sugiere que la medición de ácido úrico en suero sanguíneo es clínicamente útil y sustenta su función como biomarcador en el diagnóstico de PE. No obstante, es importante mencionar que el mejor diagnóstico de este padecimiento involucra la comparación de los niveles de AU sérico con los resultados de tensión arterial y proteinuria medidos a partir de la semana 20 de gestación.

4. Métodos electroquímicos para la detección de analitos.

La electroquímica es la rama de la fisicoquímica que se encarga de estudiar la interrelación de los efectos eléctricos y los cambios químicos, en otras palabras, los fenómenos de separación y/o transferencia de carga. En gran parte, esta rama estudia los cambios químicos causados por el paso de una corriente eléctrica y la producción de energía eléctrica mediante reacciones químicas [19].

Las tecnologías electroquímicas constituyen serias opciones de reemplazo de los métodos basados en colorimetría para el análisis de biomoléculas de intereses clínico. La electroquímica también reduce considerablemente los costos en equipo y reactivo, además de que su portabilidad es superior en todos los sentidos.

4.1 Detectores electroquímicos.

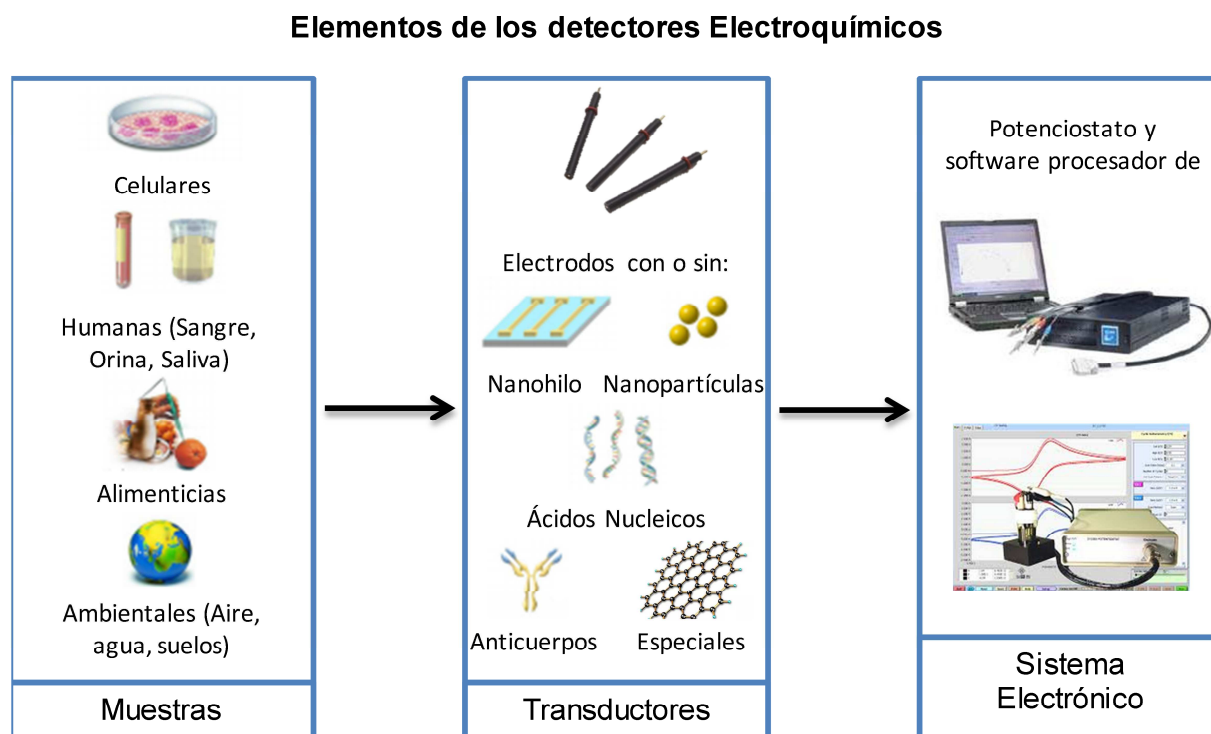


Figura 5. Elementos y componentes típicos de los detectores electroquímicos.

Los detectores electroquímicos (DEQ) pueden ser definidos como dispositivos que proporcionan una señal rápida y específica ante la presencia de un analito como consecuencia de la separación o transferencia de carga en una interfase electrodo-electrolito. El principio general de su funcionamiento consiste en que un elemento transductor puede o no estar recubierto por un modificador que reconoce el analito de interés a través de reacciones relativamente específicas (Figura 5). Una señal eléctrica de la reacción se genera por el transductor, permitiendo evaluar concentraciones de analito mediante previo análisis de resultados [20].

El gran interés que los DEQ han causado en la comunidad científica se debe principalmente a que la mayoría de las pruebas de laboratorio son costosas, tediosas e implican una gran cantidad de tiempo, algunas inclusive representan un riesgo en la salud del operario (por ejemplo aquellas que utilizan radioisótopos). En contraste, los DEQ son más rápidos, fáciles de operar, su costo es inferior y son completamente seguros.

En la literatura se reportan trabajos con dispositivos diseñados para la determinación de metabolitos, electrolitos, hormonas y drogas, mientras que en este proyecto nos enfocamos al estudio de los dispositivos que han sido desarrollados para la medición amperométrica de AU.

4.1.1 Celda electroquímica para electroanálisis.

Una reacción electroquímica es aquella que involucra un intercambio de carga cuya transferencia ocurre entre dos fases, una de las cuales es un conductor electrónico (metal) y la otra es un conductor iónico (solución) [21].

El dispositivo experimental donde ocurren los procesos de electrodo es conocido como celda electroquímica, la cual puede ser de dos o tres electrodos. Por lo general, los DEQ son sistemas de tres electrodos: trabajo, referencia y auxiliar (también denominado electrodo contador) (Figura 6).

Los componentes principales de una celda electroquímica de tres electrodos son los siguientes:

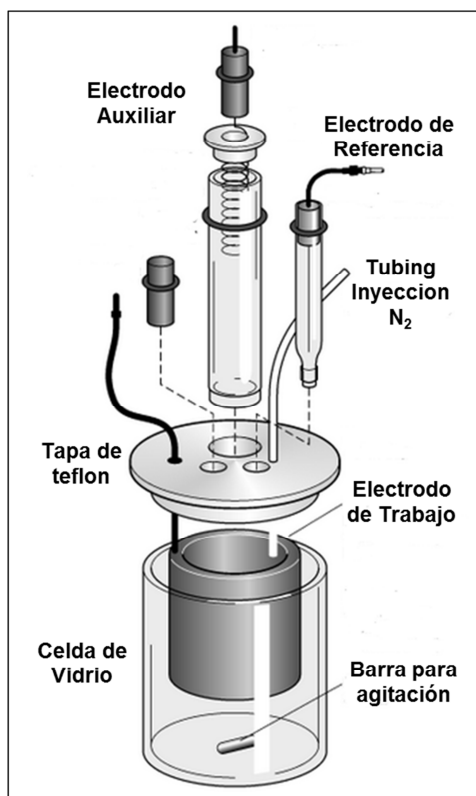


Figura 6. Arreglo típico de una celda de tres electrodos.

a) Electrodo de trabajo (WE, por sus siglas en inglés que significan Working Electrode): Es el electrodo donde ocurre la reacción de interés. Debe de ser un material conductor, por ejemplo mercurio, platino, oro y algunas formas de carbón como el vítreo.

b) Electrodo de referencia (RE): Un electrodo de referencia ideal, proporciona un potencial de referencia que no varía en el tiempo (sistema cuasiestacionario), lo que permite que el potencial del electrodo de trabajo pueda ser medido. Existen varios electrodos de referencia y su elección depende del electrolito soporte utilizado.

c) Electrodo Auxiliar (CE, por sus siglas en inglés que significan Counterelectrode): En un sistema de este tipo, la corriente de celda se monitorea a través del electrodo contador, que usualmente consiste en un alambre de platino de área mayor al electrodo de trabajo.

d) Electrolito Soporte: Generalmente es un conductor iónico en disolución con una concentración molar mínima de 100 veces con respecto a la de analito, su principal función es proporcionar conductividad al medio y reducir el transporte por migración del analito para que este difunda hacia la superficie de electrodo.

e) Potenciostato: Es el instrumento con el que se aplica potencial o corriente al sistema para obtener una respuesta electroquímica.

Dependiendo del tipo de medición que se lleve a cabo entre los electrodos, los DEQ pueden ser amperométricos (mediciones de corriente), potenciométricos (mediciones de potencial o separación de carga) o conductimétricos (mediciones de la conductividad del medio electrolítico) [22].

4.1.2 Tipos de detectores electroquímicos.

4.1.2.1 Detectores Amperométricos

Los detectores amperométricos realizan la medición continua de corriente resultante de la oxidación o reducción de una especie electroactiva en una reacción específica. Típicamente las mediciones se realizan a un potencial constante, mediante la técnica electroquímica denominada amperometría, sin embargo, cuando la medición se efectúa con variaciones de potencial, la técnica a utilizar debe de ser una

voltamperometría. El resultado característico, independientemente de la técnica utilizada, es un aumento de la corriente, cuyo valor es directamente proporcional a la concentración del analito presente en el seno de la disolución [23].

En la literatura se reportan un gran número de detectores de este tipo para la medición de biomoléculas, siendo la gran mayoría clasificados como biosensores. Los biosensores son detectores electroquímicos que poseen componentes biológicos, como enzimas o anticuerpos, que otorgan especificidad frente a la detección de analitos [25]. En próximos apartados, se presentan ejemplos de biosensores desarrollados para la medición de ácido úrico.

4.1.2.2 Detectores Potenciométricos

Con los detectores potenciométricos se estudia la interacción de un analito con el electrodo, midiéndose los cambios de potencial entre los electrodos de trabajo y referencia bajo condiciones de corriente nula entre ellos. Idealmente, los sensores potenciométricos detectan la actividad electroquímica del analito en la muestra de acuerdo a la Ley de Nernst. Un ejemplo típico de este tipo de detectores son los electrodos de ion-selectivo, que incluyen a los medidores de pH [24].

4.1.2.3 Detectores Conductimétricos

Estos dispositivos miden la capacidad de un analito para impedir el paso de una corriente eléctrica entre electrodos. El parámetro electroquímico asociado a este efecto se conoce como resistencia a la transferencia de carga. A este tipo de detectores también se les denomina como detectores impedimétricos. La técnica característica para realizar estas mediciones es la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS, por sus siglas en inglés que significan Electrochemical Impedance Spectroscopy) [23].

4.2 Técnicas usadas para la detección electroquímica.

Como se ha mencionado en el apartado anterior, los DEQ basan su funcionamiento en aplicar o medir diversos potenciales o corrientes sobre los electrodos de trabajo para relacionarlos a la concentración de un analito de interés. Esto se consigue mediante el uso de diversas técnicas electroquímicas. A continuación

se mencionan dos de las técnicas más utilizadas: voltamperometría cíclica y cronoamperometría.

4.2.1 Voltamperometría cíclica.

La voltamperometría cíclica (CV, por sus siglas en inglés que significan Cyclic Voltammetry) es la técnica electroquímica más utilizada, ya que permite la rápida localización de los potenciales redox de las especies electroactivas, permitiendo evaluar los efectos del medio, los procesos de transferencias de carga, procesos de adsorción y reacciones de acoplamiento que se llevan a cabo en el electrodo [25].

La CV consiste en aplicar un barrido de potencial al WE entre dos valores (Potencial inicial y final), una vez alcanzado el potencial final, se ejecuta un barrido de reversa hasta el potencial inicial, completándose así un ciclo (Figura 7), durante el cual el potenciostato mide la corriente del circuito. El número de ciclos y velocidad del experimento, depende del estudio que se realiza y los parámetros termodinámicos que se desean obtener. Las mediciones obtenidas, son gráficos de corriente contra potencial y se denominan voltamperogramas.

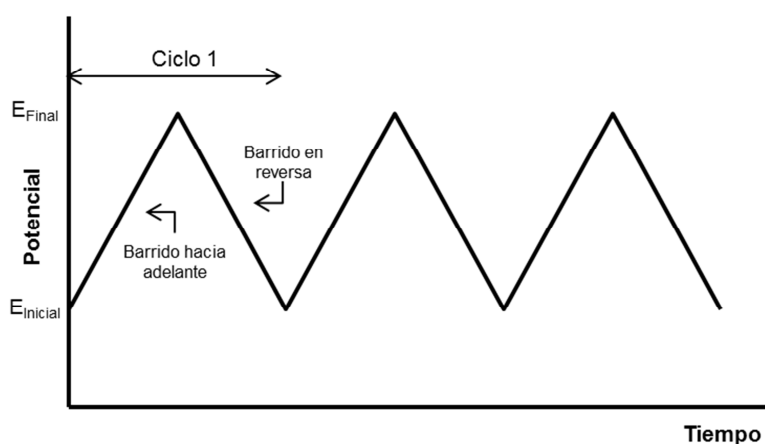


Figura 7. Perturbación potencial-tiempo en un experimento de voltamperometría cíclica.

La Figura 8, muestra la respuesta esperada para un sistema redox de transferencia electrónica rápida (reversible), donde se observan dos picos correspondientes a la oxidación y reducción de los analitos del medio (O, R), respectivamente. El incremento de corriente de pico, se debe a la formación de la capa de difusión en las cercanías de la superficie del electrodo, propio del proceso faradaico

(cambio del estado de oxidación de las especies electroactivas) que ocurre en la interfase [25].

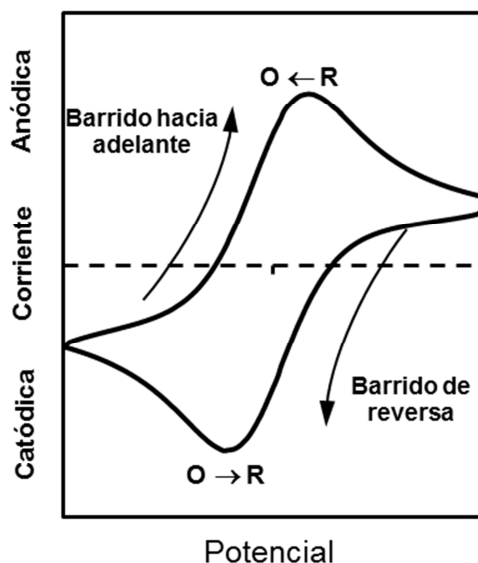


Figura 8. Voltamperograma cíclico típico para un proceso reversible $O + ne^- \leftrightarrow R$

4.2.2 Cronoamperometría.

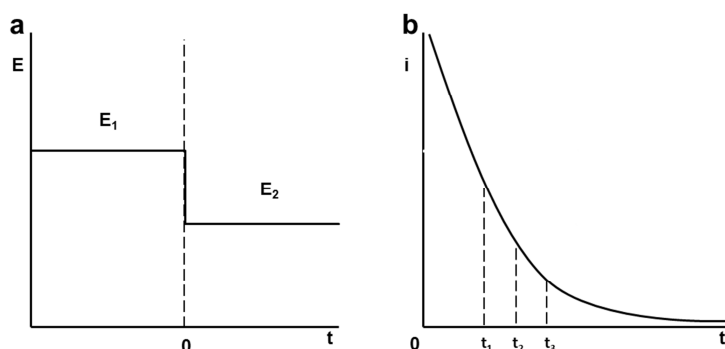


Figura 9. (a) Representación esquemática del cambio de potencial en CA, (b) variación de corriente resultante en función del tiempo.

La cronoamperometría (CA) consiste en aplicar un pulso de potencial escalonado al WE durante un tiempo determinado para medir la corriente resultante (Figura 10a). Las mediciones suelen partir del potencial de equilibrio (E_1), para después cambiar súbitamente a un potencial (E_2), donde ocurra el proceso faradaico de interés. Las respuestas en corriente que se registran en los gráficos corriente vs tiempo

(cronoamperogramas), son producto de los fenómenos de transferencia de carga y masa que ocurren en la capa de difusión interfacial (Figura 9b) [25].

4.2.3 Voltamperometría de pulso diferencial.

La voltamperometría de pulso diferencial (DPV) es una de las técnicas más útiles en electroanálisis para la medición de concentraciones de analitos orgánicos e inorgánicos. En DPV, pulsos de magnitud ajustada son superpuestos a una rampa de potencial lineal y aplicados al WE (Figura 10).

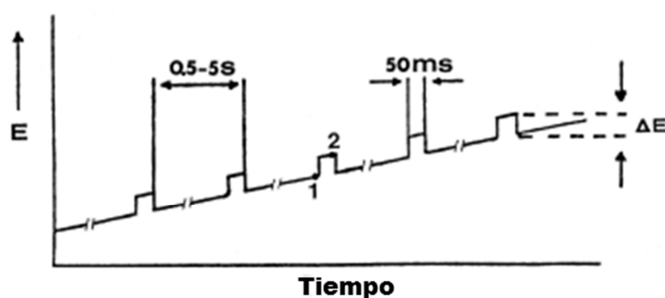


Figura 10. Señal de excitación para la voltamperometría de pulso diferencial

La corriente es muestreada dos veces: antes de la aplicación del pulso (Punto 1) y casi al terminar el mismo (Punto 2, cuando la corriente capacitiva tiene la menor contribución a la corriente total). La diferencia de corrientes es graficada contra el potencial aplicado. El voltamperograma de pulso diferencial resultante (Figura 11), consiste en un pico de corriente, cuya altura de pico es directamente proporcional a la concentración del analito correspondiente [25].

La aplicación del pulso diferencial resulta en una corrección muy efectiva de la capacitancia de la corriente de fondo, lo que se refleja en un incremento en la detección y sensibilidad, permitiendo incluso separar las respuestas de dos especies con potenciales redox similares (Figura 11) [25].

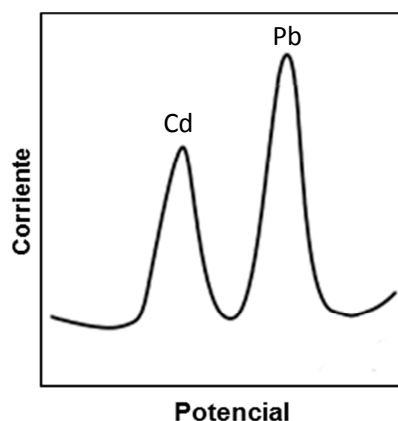


Figura 11. Voltamperograma de pulso diferencial para una mezcla de 1 mg/L de iones de cadmio y plomo, electrolito HNO_3 0.1M. Tomada y modificada de [25].

4.3 Materiales de los electrodos de trabajo.

El buen desempeño de los procedimientos electroquímicos mencionados en el apartado anterior, está influenciado en gran parte por el material del WE, el cual debe de proveer alta sensibilidad, selectividad y reproducibilidad. La selección del material del WE depende principalmente de dos factores: el comportamiento redox del analito objetivo y la corriente de fondo sobre la región de potencial requerida para la medición [25].

Existen diversos materiales que encuentran aplicación como WE en el área de electroanálisis, siendo los más utilizados aquellos que se encuentran en estado sólido y que se componen de carbono o metales nobles como platino y oro. Las principales características de estos materiales consisten en que poseen una ventana de potencial adecuada a la región de trabajo en detección electroquímica, tienen buena conductividad eléctrica, gran reproducibilidad de la superficie, atractivas propiedades mecánicas, bajo costo, alta disponibilidad comercial y baja toxicidad. Electrodo de plata, níquel y cobre también suelen ser utilizados para aplicaciones muy específicas.

Un factor importante a tomar en cuenta en los electrodos en estado sólido, versa en preguntarse si la superficie de electrodo en cuestión posee las propiedades fisicoquímicas necesarias para efectuar el proceso de detección electroquímica deseado. De no poseerlas, una opción atractiva para sobrepasar esta problemática consiste en modificar químicamente la superficie con los componentes moleculares

adecuados que le otorguen propiedades electroquímicas con reconocimiento molecular. Suelen aplicarse métodos de pretratamiento y limpieza, como, pulidos mecánicos con materiales abrasivos que involucran alúmina o polvos de diamante que permiten tener una superficie homogénea para la buena reproducibilidad de los experimentos. Posteriormente a estos tratamientos mecánicos, también pueden utilizarse tratamientos fisicoquímicos y térmicos que permiten activar las superficies para incrementar los rendimientos de las reacciones químicas empleadas ex profeso durante la modificación final de los electrodos [25].

4.3.1 Electrodo de carbono.

Los electrodos de carbono son los más ampliamente utilizados en electroanálisis, primeramente por su extensa ventana de potencial, baja corriente de fondo, su rica superficie química, bajo costo y su gran capacidad para el sensado y detección en diversas aplicaciones. En contraste, las velocidades de transferencia electrónica observadas son más bajas en comparación con los electrodos metálicos, esto debido a la superficie del carbón [25].

Los electrodos de carbono más populares son los electrodos de carbón vítreo (GC, por sus siglas en inglés que significan Glassy Carbon), pasta de carbón, fibra de carbón, electrodos serigrafados con tinta de carbón (SPEC, por sus siglas en inglés que significan Screen Printed Electrode based on Carbon), películas de nanotubos de carbono de pared sencilla y multipared y otros composites. Las propiedades del GC son descritas en la siguiente sección.

4.3.1.1 Electrodo de carbón vítreo.

El carbono tiene cuatro alotropos cristalinos: diamante (enlace sp^3), grafito (sp^2), carbino(sp^1) y fulerenos (sp^2 distorsionado, que incluye a los nanotubos de carbono y nanocébollas), pero solo dos alotropos se encuentran naturalmente como minerales, el grafito y el diamante, las otras formas son sintéticas. Comercialmente, existen numerosas formas de grafito, en las cuales su microestructura fue alterada para modificar sus propiedades, siendo uno de los materiales más interesantes y aplicados como material de electrodo, el electrodo de carbón vítreo (GCE, por sus siglas en inglés que significan Glassy Carbon Electrode) [26].

Propiedad	Unidad	Carbón Vítreo	
Resistente al calor hasta	°C	1300	3000
Densidad aparente	g cm ⁻³	1.46-1.5	1.43-1.48
Dureza	Mohs	4-5	-
Fuerza de tensión	Kg cm ⁻³	500-1000	-
Resistividad eléctrica	10 ⁻⁴ Ω cm	35-50	30-35
Contenido de ceniza	%	0.1	0.05
Permeabilidad de gas	cm ³ s ⁻¹	10 ⁻¹¹ -10 ⁻¹³	10 ⁻⁹
Conductividad térmica	kcal m ⁻¹ h ⁻¹ K ⁻¹	3-4	13-15
Coefficiente de expansión térmica	10 ⁻⁶ K	1.8-2.2	-

Tabla 4. Algunas propiedades físicas del carbón vítreo

El GC se produce por la degradación térmica de resinas poliméricas, típicamente, resinas fenólicas. La resina precursora es curada, carbonizada lentamente y después calentada lentamente a altas temperaturas. Las propiedades físicas que exhibe el GC, son dependientes del tratamiento térmico al que se someten, el cual puede variar desde 600 a 3000°C (Tabla 4). Además, el GC exhibe tiempos de oxidación mucho menores, en comparación con otros materiales grafiticos, sugiriendo que es químicamente inerte (Tabla 5) [27,28].

Tipo	Tiempo de reacción (min) por pérdida de peso (%)			
	70	80	90	100
Grafito	68	95	110	140
Pirografito	120	138	175	250
Grafito de alta densidad	160	185	225	275
Carbón Vítreo	205	255	270	365

Tabla 5. Tiempos de reacción de materiales grafiticos a 800 ± 5 °C en N₂:O₂ = 81:19

La estructura del GC implica delgadas cintas de grafito enredadas como capas, las cuales tienen una estructura porosa aislada (los poros pueden no estar conectados entre sí), esto es producto de las cavidades formadas por la orientación aleatoria y complicada de las láminas aromáticas que se apilan una encima de otra formando microfibrillas, las cuales pueden verse en la Figura 12. Esta peculiar estructura, le proporciona una rigidez con fuerzas de tensión y compresión mayores a las del grafito [27,28].

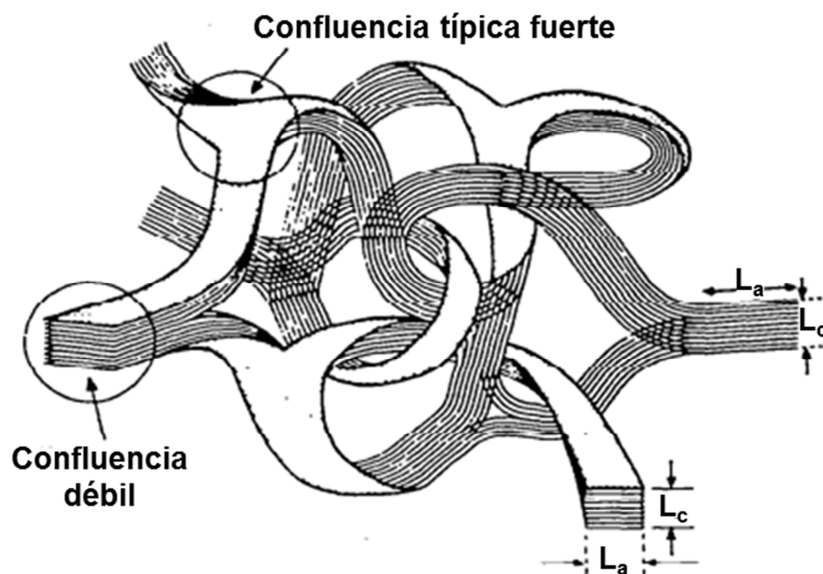


Figura 12. Esquema del modelo estructural del carbón vítreo más aceptado. El tamaño de cristalito para las microfibrillas orientadas al azar es sólo L_a (50Å) x L_c (15Å).

Conocer las propiedades físicas del GC es indispensable para comprender los procesos electroquímicos que pueden llevarse a cabo en su superficie. Tratando exclusivamente los electrolitos acuosos, Randin y Yeager [29] demostraron la presencia de grupos funcionales en la superficie de GCEs mediante el estudio de la capacitancia diferencial sobre el borde (plano perpendicular al plano basal), la cual, de acuerdo a sus experimentos, resultó ser mayor al plano basal. Fue confirmada por el trabajo de Laser y Ariel [30], quienes estudiaron el comportamiento anódico del GC en medio ácido, concluyendo en general, que la formación de pares redox en el GC es causada por la adsorción química de oxígeno y reacciones redox irreversibles de los grupos de la superficie. Dieker y col.[31] demostraron que la corriente residual en varias marcas de GCEs, tanto en sentido anódico como catódico, no puede ser atribuida a impurezas electroactivas de la disolución, sugiriendo que la superficie del GC es la que se oxida y reduce. Majer y col. [32], demostraron que la electroactividad residual de los electrodos de GC se debe a la presencia de grupos que contienen oxígeno, tales como los grupos carboxilo, carbonilo e hidroxilo.

Asociado a esto existen muchos trabajos realizados respecto a la activación de los grupos funcionales presentes en la superficie de los GCEs. Mecánicamente esto se consigue por diversos métodos: Pulidos con carburo de silicio, pasta de diamante o

alúmina. Se ha demostrado que aquellos electrodos con un mejor pulido, presentan más oxígeno superficial, en clara asociación a la presencia de grupos funcionales como fenoles y carbonilos [33]. GCEs irradiados con ultrasonido en solventes, mostraron mejores tasas de transferencia electrónica para pares redox conocidos; mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés que significan Scanning Electron Microscopy). Se demostró que esto se debe por modificaciones en el estado superficial del GCE y no por cambios en el área electroactiva de los electrodos [34]. Algunos otros mecanismos reportados son calentamiento al vacío [35] e irradiación con láser [36].

En relación al punto anterior, el pretratamiento y activación electroquímicos suelen ser los métodos más usados para mejorar considerablemente las respuestas electroquímicas, porque muestran buena reproducibilidad y son técnicas fáciles de operar [37]. Algunos ejemplos son la anodización, donde se logra la activación del GCE mediante capas de óxido sobre su superficie [38]. Engstrom y Strasser [39] consiguieron activar GCEs aplicando un potencial conocido durante determinado tiempo, estudiando las mejoras físicas, químicas y funcionales de la activación, comprobando así mismo que este pretratamiento limpia la superficie de contaminantes introducidos durante el pulido y mejora la electroactividad, sin cambios en la topografía de la superficie.

4.3.2 Electroodos químicamente modificados.

El término de electrodos químicamente modificados (CMEs por sus siglas en inglés que significan Chemically Modified Electrodes), es acuñado por Murray y col. [40] en 1979, cuando demostró mediante la espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS, por sus siglas en inglés que significan X-ray photoelectron spectroscopy) la modificación de la superficie de electrodos de SnO₂ con grupos amino (NH₂). Esta nueva superficie aminada, representó una importante mejora, ya que permite unir moléculas que funcionalizan la superficie de electrodo, dotándolo de nuevas propiedades fisicoquímicas.

De acuerdo a la IUPAC, los CMEs se definen como electrodos hechos de un material conductor o semiconductor que están recubiertos con una película química modificadora monomolecular, multimolecular, iónica o polimérica, y que mediante reacciones farádicas (de transferencia de carga) o diferencias de potencial interfacial

(sin transferencia de carga neta) exhiben propiedades químicas, electroquímicas y ópticas de la película [41].

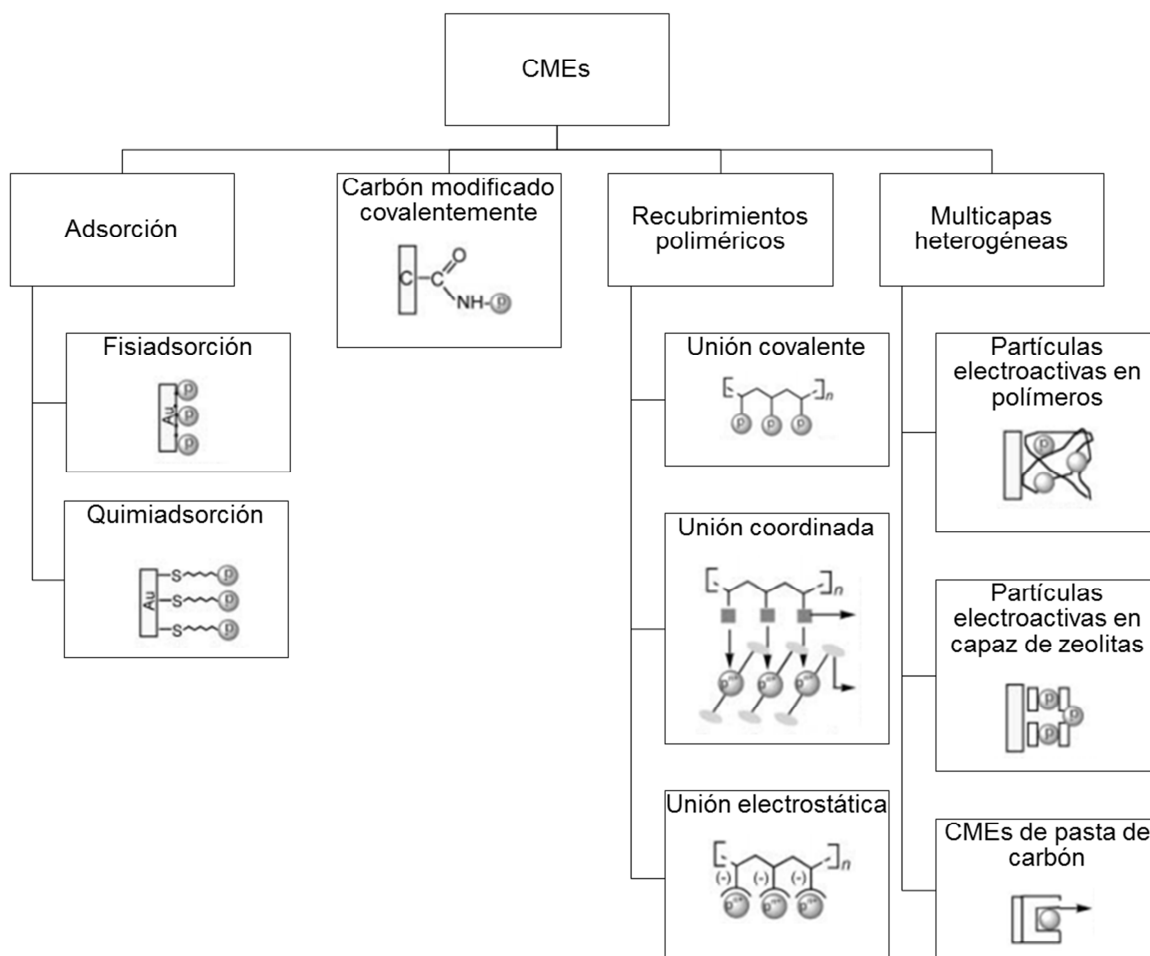


Figura 13. Representación esquemática de varias rutas para la modificación de electrodos.

El modificador de un electrodo es seleccionado para bloquear la comunicación de la base del sustrato con el analito o bien, para promover algunos procesos de óxido reducción, actuando como electrocatalizador en algunos casos, o bien como mediador redox de reacciones que no son espontáneas por la naturaleza de la interacción del analito con el sustrato [42].

Los CMEs se pueden obtener a partir de metodologías que involucran la fisiadsorción o quimiadsorción (Figura 13) y sus principales aplicaciones en el área del electroanálisis son: (1) preconcentración, (2) electrocatálisis y (3) bloqueo de interferencias [41].

4.3.2.1. Electrocatalisis

Una importante motivación para la modificación de superficies de electrodo es la electrocatalisis. En los procesos de electrodo de un analito deseado, los CMEs han generado cambios en la cinética de los proceso redox, ocurriendo a un menor potencial, con un incremento de corriente o una mayor tasa de transferencia electrónica de la que ocurrirá con un electrodo sin modificar (“desnudo”) [43].

En electroanálisis se busca la modificación de electrodos que promuevan la electrocatalisis, consiguiendo electrodos selectivos que permiten la definición y estilizado de corrientes de pico.

4.3.2.2. Preconcentración.

La preconcentración (captación preferencial) de sustrato o analitos (iones/moléculas) es otra área de utilidad de los CMEs. En la práctica, la superficie del electrodo se modifica eligiendo un reactivo capaz de acumular el analito de interés. El mecanismo de este proceso está determinado por la naturaleza de la reactividad del radical modificado, y los mecanismos de preconcentración más comunes se basan generalmente en los fenómenos de reconocimiento molecular (por ejemplo, las interacciones hidrofóbicas), coordinación o fenómenos electrostáticos (por ejemplo, las interacciones de intercambio iónico o ligando). En electroanálisis, la acumulación del analito en el modificador químico conduce a una mayor sensibilidad gracias a una selectividad mejorada [41].

4.3.2.3 Nanopartículas como modificador de electrodo.

El tamaño, la forma, la composición y las estructuras cristalinas de las nanopartículas de metales nobles son los parámetros clave en la determinación de su rendimiento. Las investigaciones en el campo de los nanomateriales, se han enfocado a evaluar los efectos en el comportamiento catalítico causado por las diferentes formas y estructuras de las nanopartículas. Las partículas hechas a la medida, como Au, Pt, Pd y Pt, han mostrado excelentes actividades electrocatalíticas hacia diversos tipos de analitos. Este trabajo está dedicado al uso de nanopartículas de oro (AuNps) para la construcción de detectores electroquímicos.

Al respecto, Tang y Cheng [52] inmovilizaron AuNps sobre electrodos de ITO para investigar la dependencia de la electrocatálisis al tamaño y forma de la nanopartícula. Mediante la reacción de oxidación de metanol y la reacción de reducción de oxígeno, demostraron que aquellas partículas con forma similar, es el tamaño el que determina las densidades de corriente: tamaños de partícula más pequeños llevaron a mayores densidades de corriente, debido a la mayor proporción de densidad electrónica por unidad de volumen. Para partículas con tamaños comparables, la forma o estructura cristalina rige la selectividad de las reacciones electrocatalíticas (Figura 14).

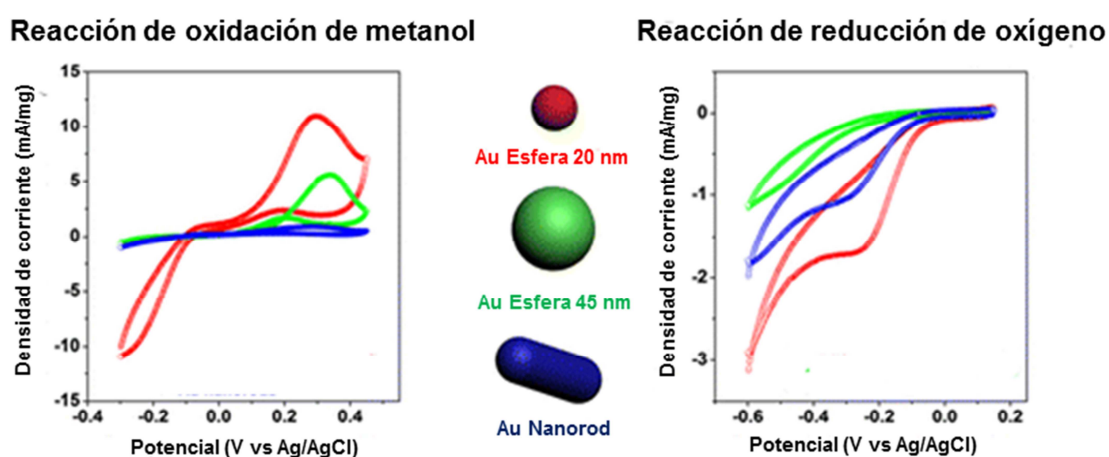


Figura 14. Respuestas voltamperometricas de CMEs ITO/AuNp para diversos tamaños y formas. Tomada y modificada de [52].

5. Dendrimeros para la funcionalización de electrodos.

Los polímeros pueden tener una estructura lineal, reticulada o ramificada. A los polímeros sintéticos hiperramificados a partir de un núcleo central se les denomina polímeros dendríticos debido a su similitud con ramas de árbol o micelas unimoleculares. El término dendrímero fue introducido en la década de los 80's por Tomalia y col.[56] cuando reportaron la síntesis de lo que entonces llamaron "dendrimeros starburst". Estos dendrímeros se diferencian de los monómeros y oligómeros clásicos por su extraordinaria simetría y alta ramificación. Los dendrimeros poseen grupos terminales reactivos que permiten: (a) crecimiento controlado del peso molecular, (b) la ramificación controlada (topología), y (c) versatilidad en el diseño y la modificación de los grupos finales terminales. La síntesis de dendrímeros se lleva a cabo por una variedad de estrategias que implican técnicas de "tiempo de propagación

secuenciado" alrededor del núcleo que se conocen como síntesis convergente o divergente de dendrones. Los dendrímeros resultantes crecen de una forma geoméricamente progresiva a manera de "generaciones" de propagación, su estructura química es tridimensional (globular) y se divide en tres regiones típicas: (i) un núcleo, (ii) capas de ramificaciones (dendrones) que siguen un patrón generacional y exponencial y (iii) grupos externos o periféricos (figura 15) [59].

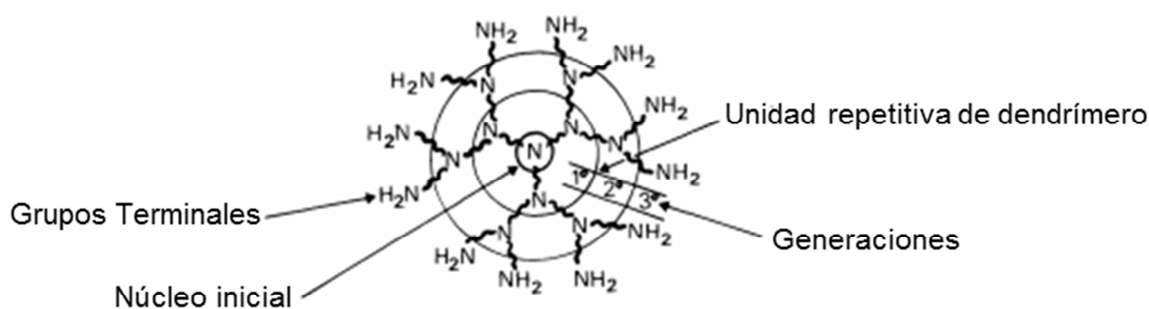


Figura 15. Esquema representativo de un dendrímero generación 3.

Debido a su estructura macromolecular única y bien definida, los dendrímeros poseen una gran variedad de aplicaciones constituyendo una fascinante herramienta para la construcción de materiales a escala nanométrica. En los últimos años la investigación en el campo de la química dendrítica ha experimentado un desarrollo exponencial, tanto en el área académica, como en la tecnológica. Las arquitecturas dendríticas ofrecen ventajas únicas con respecto a otras macromoléculas y polímeros convencionales tales como: múltiples grupos funcionales y su versatilidad para facilitar posteriores modificaciones químicas, baja dispersividad en pesos moleculares, baja viscosidad, reducido enredamiento molecular y tamaño nanoscópico dentro del rango de 1-10 nm [57].

Aunque el crecimiento generacional dendrítico es esquemáticamente similar, la conformación química entre dendrímeros difiere por los grupos funcionales de los que proviene dicho crecimiento. Por ejemplo, los dendrímeros de poliamidoamina mejor conocidos como PAMAM (comercialmente disponibles) parten de un núcleo de etilendiamina ($H_2NCH_2CH_2NH_2$) y terminan en grupos funcionales hidroxilo (OH), carboxilo (COOH) o amino primario (NH₂) (Figura 16).

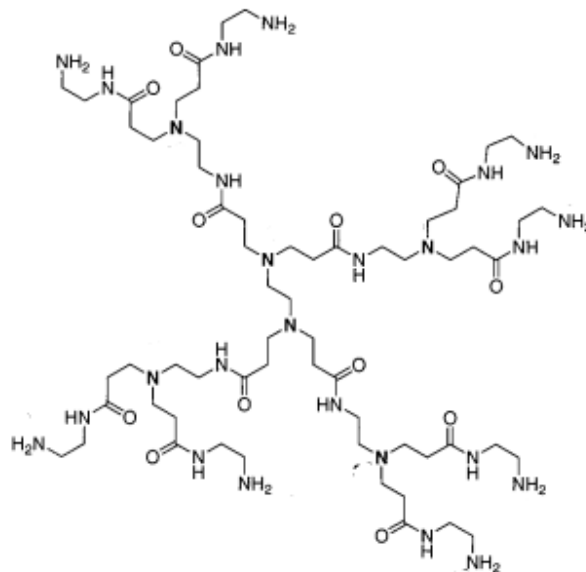


Figura 16. Estructura de un dendrímero PAMAM de terminación aminada generación 3.

Estudios sobre el confinamiento de 2-naftol en el interior de dendrímeros PAMAM generaciones 2.0, 4.0 y 6.0 conteniendo (16, 64 y 256 grupos NH₂ periféricos terminales, respectivamente), revelaron que las aminas terciarias no protonadas (-N<) localizadas en el interior de los dendrímeros son capaces de establecer puentes de hidrógeno entre los grupos -OH de naftol (Figura 17) [58].

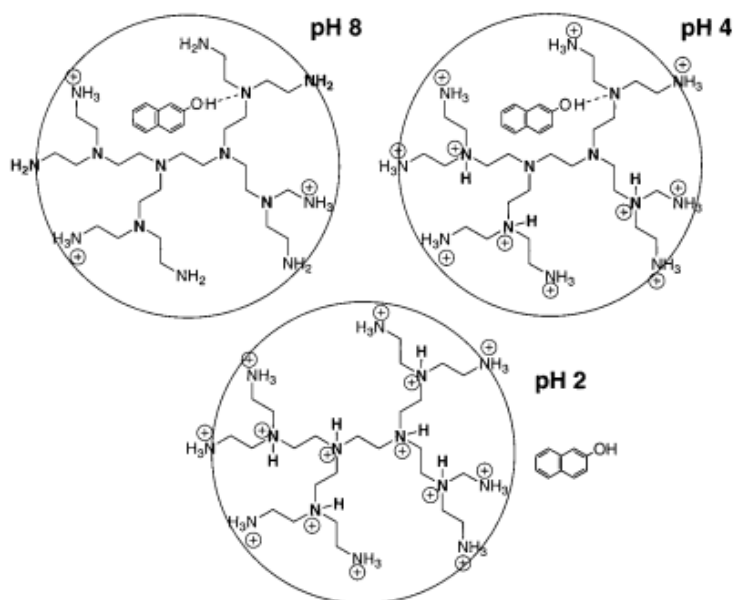


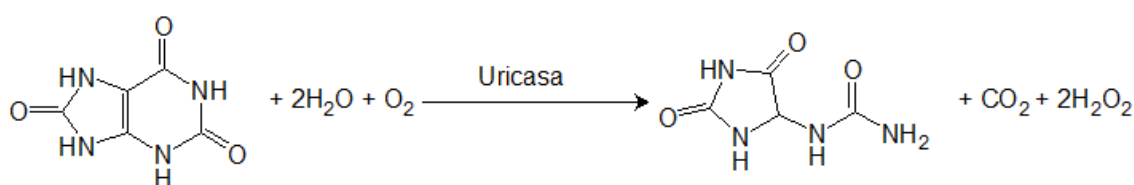
Figura 17. Esquematización de la interacción del 2-naftol como función del pH predominante en medio acuoso, tomada y modificada de [58].

Sección 2: Antecedentes

1. La medición habitual de ácido úrico.

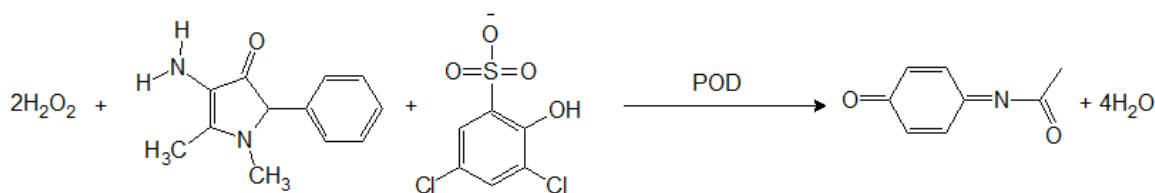
Anteriormente el ácido úrico era medido con la reducción química de complejos fosfotungsticos (Método Folin-Denis) lo que involucraba procesos muy complejos [14, 15,16], llevándolo a ser gradualmente remplazado por los métodos enzimáticos que emplean la uricasa y miden la concentración de uno de los productos de reacción: alantoína o peróxido de hidrógeno [17].

Para la determinación de AU actualmente se emplea un procedimiento colorimétrico enzimático automatizado que es útil para muestras de suero sanguíneo u orina. El primer paso consiste en la oxidación del AU, por medio de la uricasa (también denominada como urato oxidasa), una enzima que poseen animales tales como los primates y las aves, permitiéndoles convertir el AU en productos de eliminación [1]. El producto de esta reacción es alantoína y peróxido de hidrógeno (Reacción 1).



Reacción 1. Oxidación de AU a alantoína y peróxido de hidrógeno (25 °C, Buffer de fosfatos pH 7.4).

El peróxido de hidrógeno en presencia de peroxidasa (POD), 4-aminofenazona (4-AF) y 2-4 diclorofenol sulfonato (DCPS) forma una quinonaimina de color rosáceo (Reacción 2). La intensidad de la quinonaimina es analizada en un espectrofotómetro UV-vis, donde con previa calibración de un blanco y análisis de un patrón, se lee una absorbancia a 520 nm, la cual debe ser proporcional a la concentración de ácido úrico presente en la muestra ensayada [18].



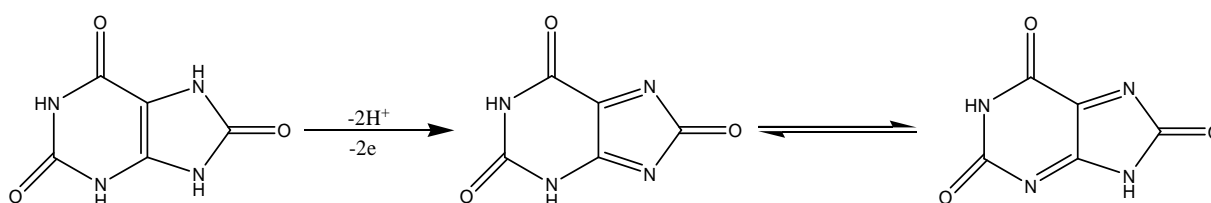
Reacción 2. Formación de quinonaimina roja (25 °C, Buffer de fosfatos pH 7.4).

Los laboratorios clínicos y hospitales utilizan kits comerciales que contienen las enzimas y patrones necesarios para la ejecución del método. El procedimiento a seguir es relativamente fácil de reproducir, sin embargo los reactivos deben de mantenerse en frascos bien cerrados y a una temperatura de 2 a 8 °C, protegidos de la luz para evitar su caducidad prematura. Aunado a esto, las muestras de suero o plasma tienen una estabilidad de 3 a 5 días cuando son refrigeradas de 2 a 8°C.

Además, rigurosamente hablando, el método es indirecto, ya que es la absorbancia de la quinoaimina, la que se extrapola hacia concentraciones de AU contra un patrón. Estas circunstancias han creado un nicho de oportunidad para los grupos de investigación que en la última década han trabajado en desarrollar nuevos métodos para la determinación de AU.

2. Detectores y biosensores electroquímicos para la detección de ácido úrico.

En la literatura se reportan diversos dispositivos para la medición de ácido úrico, basando su funcionamiento en las técnicas electroquímicas y fundamentos teóricos anteriormente mencionados.



Reacción 3. Mecanismo propuesto para la oxidación de ácido úrico.

Huang y col. [44] propusieron el mecanismo para la oxidación de ácido úrico que se presenta en la Reacción 3. Su trabajo consistió en la modificación de electrodos de oro con nanotubos de carbono para estudiar los procesos de electrodo y transferencia de carga utilizando el ácido úrico como ejemplo. Demostraron que las terminaciones carboxiladas de los nanotubos, incrementan la actividad electroquímica del ácido úrico (AU) y que un interferente como el ácido ascórbico (AA) presenta respuesta electroquímica poco significativa.

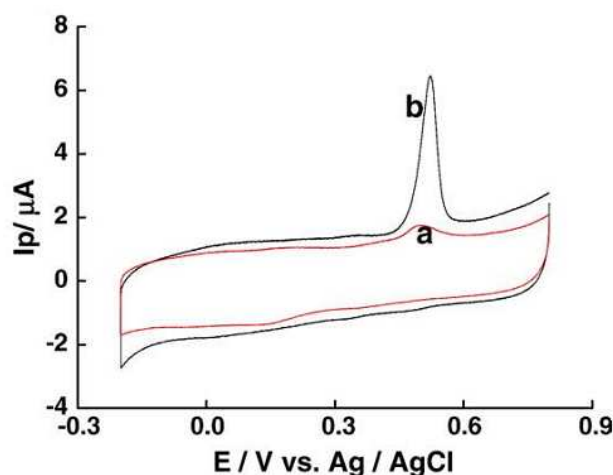


Figura 18. CV de AU 10 μM en (a) GCE desnudo (b)GCE/poly Evans Blue. Velocidad de barrido 100 mV/s. Tomada de [45]

Por otro lado, Lin y col. [45] electropolimerizaron GCEs pretratados en medio básico usando películas del polímero comercial Evans Blue, encontrando excelentes respuestas electrocatalíticas para dopamina (DPA), AU y AA. La Figura 18 muestra el voltamperograma obtenido para el proceso redox del AU, en donde se puede observar que el potencial de oxidación es prácticamente el mismo, sin embargo la corriente de pico del electrodo modificado aumenta significativamente. El mismo efecto ha sido reportado por otros autores, quienes mediante el mismo concepto de pretratamiento, han modificado las superficies de GC con grupos carboxilo, logrado la electrocatálisis de los procesos [46,47].

Otro modificador de GCEs ampliamente reportado para la medición de AU son los nanotubos de carbono. Bi y col. [48], modificaron GCE con nanotubos de carbono con terminaciones carboxiladas e hidroxiladas, reportando mayor electroactividad aquellos que tenían grupos $-\text{COOH}$. Resultados similares son reportados en la literatura [44,49].

Por otro lado, CMEs con nanopartículas metálicas se utilizan cada vez más en muchas aplicaciones electroquímicas debido a sus propiedades catalíticas extraordinarias. Características de nanopartículas de oro tales como la alta relación de superficie-volumen, alta energía superficial, capacidad para disminuir la distancia entre las proteínas y las partículas de metal, y el funcionamiento como conductor electrónico entre grupos funcionales y la superficie del electrodo, son razones que justifican la

modificación de electrodos para facilitar la transferencia de electrones entre los analitos redox y superficies de los electrodos [50,51].

Con respecto a lo anterior, el depósito de AuNps sobre GCEs ha mostrado capacidad de preconcentración de AU [53-55] que resulta en una mejor actividad electrocatalítica en la determinación de AU en orina y/o suero sanguíneo. Sin embargo, la respuesta de AU en el suero sanguíneo es típicamente interferida por la oxidación simultánea del AA y DPA, haciendo más difícil la diferenciación electroquímica de las respuestas.

En este sentido, se abre la oportunidad para el desarrollo de nuevos CMEs que sean funcionalizados con materiales que favorezcan la preconcentración del AU sobre el AA. En este contexto, los dendrímeros constituyen una propuesta viable.

Recientemente, compositos del tipo dendrímeros PAMAM-OH/nanopartículas de Pd fueron sintetizados y aplicados en la construcción de un detector electroquímico de dopamina en orina [59]. Con base en este trabajo, se sabe que aquellas macromoléculas contenidas en las muestras de orina que pudieran haber sido adsorbidas no específicamente en la superficie del electrodo no parecen haber tenido un efecto significativamente negativo sobre las propiedades electroquímicas del sustrato así modificado. Este resultado sugirió que los materiales dendríticos (poliamidoamina generación 4.0-OH) confinados a la superficie estudiada son capaces de inhibir el efecto pasivante de proteínas contenidas en la orina, debido a que sus grupos terminales OH proporcionan a la interfase un carácter altamente polar e hidrofílico no apto para la interacción con proteínas.

Sección 3: Propuesta del proyecto

1. Objetivos

1.1 Objetivo General.

Modificar electrodos de carbón vítreo con nanopartículas de oro recubiertas con cisteamina y dendrímeros de poliamidoamina generación 4.5 para la detección amperométrica altamente selectiva de ácido úrico en suero sanguíneo humano.

1.1.1 Objetivos Específicos.

- Modificar superficies de electrodo con nanopartículas de oro recubiertas con cisteamina y dendrímeros de poli(amidoamina) generación 4.5 (PAMAM-G4.5).
- Validar el empleo de los electrodos así modificados frente a la evaluación altamente selectiva de la concentración de ácido úrico en muestras de suero sanguíneo de pacientes con riesgo a presentar preeclampsia.
- Acoplar los electrodos modificados a un dispositivo portátil para la medición de ácido úrico en suero sanguíneo con base a las condiciones encontradas durante la etapa de validación.

2. Justificación

La Secretaria de Salud (SS) en México reportó que durante el 2005 se presentaron 1,242 defunciones maternas, casi 34% del total fueron a causa de la Preeclampsia (PE) [8]. El método enzimático colorimétrico, actual ruta de análisis del suero sanguíneo para la medición de ácido úrico, requiere un control estricto para la conservación del kit enzimático (2-8 ° C, oscuridad, 1 mes máximo) y muestras de suero sanguíneo (2-8 ° C, 3-5 días máximo). Además de que es un método indirecto que requiere al menos 1000 uL de suero sanguíneo para su análisis y un tiempo de respuesta comprendida entre 3 y 24 horas.

3. Hipótesis

(1) La oxidación de ácido úrico en electrodos de carbón vítreo será promovida si su superficie es modificada por nanopartículas de oro.

(2) Los efectos de corriente capacitiva asociada a la electroactividad residual de los electrodos de carbón vítreo disminuirá si las nanopartículas de oro son confinadas en los sitios responsables de tal electroactividad.

(3) La preconcentración de ácido úrico en la interfase electrodo/electrolito será promovida si dendrímeros de poli(amidamina) se logran asociar por vía química a las nanopartículas de oro previamente confinadas.

(4) Los efectos de matriz serán minimizados si los dendrímeros de poli(amidoamina) confinados poseen una buena cantidad de grupos carboxilo por unidad dendrítica.

Sección 4: Desarrollo experimental

1 Modificación de GCEs con nanopartículas de oro recubiertas con cisteamina (AuNp@cisteamina) y con dendrímeros PAMAM G 4.5.

1.1 Preparación de las nanopartículas de oro.

Entre los métodos convencionales de síntesis de AuNPs por reducción de Au (III), el más popular durante mucho tiempo ha sido aquel que utiliza citrato de sodio como agente reductor de HAuCl_4 en agua, método que fue introducido por Turkevich en 1951 [61]. Las AuNp@cisteamina fueron obtenidas modificando ésta y otras metodologías previamente reportadas [62], donde la técnica de síntesis consiste en utilizar compuestos que se unan fuertemente a las nanopartículas. Los tioles, como el clorhidrato de cisteamina, son compuestos que contienen azufre (Figura 19), permitiéndoles lograr uniones de tipo covalente con metales nobles que incluyen al oro. [63].

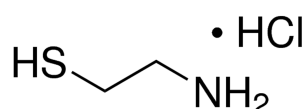


Figura 19. Molécula del clorhidrato de cisteamina

El ion AuCl_4^- se reduce por acción del NaBH_4 mediante el siguiente protocolo: Una solución 0.5M de cisteamina (60 μL) se agrega a una solución 1mM de HAuCl_4 (15 mL) bajo agitación, e inmediatamente después se agrega lentamente y por goteo una solución 8mM de NaBH_4 (5mL, previamente enfriados a 4 $^\circ\text{C}$) (Figura 20).

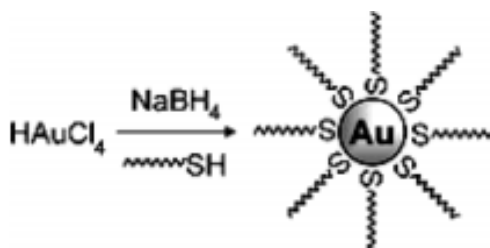


Figura 20. Esquematización de la síntesis de nanopartículas de oro en la presencia de clorhidrato de cisteamina.

1.2 Electrodeposición de las AuNp sobre GCEs.

Como pretratamiento superficial, los GCEs fueron pulidos hasta conseguir un acabado de espejo. El pulido fue realizado con alúmina ($\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$) 0.3 μm de tamaño de partícula sobre paño buehler y enjuagado con agua deionizada (18.2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$).

Los experimentos se desarrollaron usando un potenciostato Epsilon BAS conectado a una celda electroquímica de 3 electrodos, donde un alambre de Pt fue usado como electrodo contador y los potenciales referenciados a un electrodo de $\text{Ag}|\text{AgCl}$ (3M NaCl) a menos que se indique otra cosa.

Siguiendo la metodología previamente reportada por nuestro grupo de investigación [60], en una celda electroquímica con disolución fresca de AuNp@cisteamina (15 mL), se sumergen los GCE y se aplican 0.1V vs. $\text{Ag}|\text{AgCl}$ (3M NaCl) por 40s, esperando que los grupos $-\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_3^+$ de las AuNp@cisteamina formen enlaces covalentes con los sitios electroactivos de las superficies de los GCEs como se ilustra en la Figura 22 [65,66].

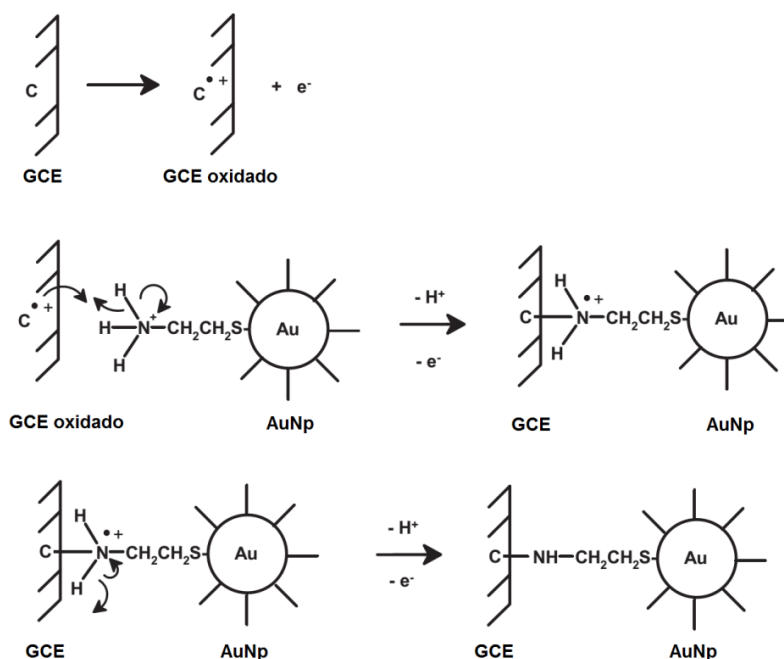


Figura 21. Mecanismo propuesto para explicar la electroadsorción de AuNp@cisteamina en GCEs. Tomada de [68].

1.3 Quimiadsorción de dendrímeros.

Finalmente los GCEs modificados con las AuNp@cisteamina se sumergen por 48h en una solución de MeOH con 10mM etilcarbodimida (EDC) + 18 μ M dendrímeros PAMAM generación 4.5 (128 terminales carboxiladas), siguiendo la metodología previamente reportada [67].

Sección 5: Resultados

1. Modificación de GCEs con nanopartículas de oro recubiertas con cisteamina (AuNp@cisteamina) y con dendrímeros PAMAM G 4.5

La formación de nanopartículas de oro se evaluó mediante espectroscopia UV-Vis (el análisis se realizó en un espectrofotómetro UV-Vis Ocean Optics USB2000 + F0009 UV-Vis en cubeta de cuarzo rectangular) vía la aparición de un pico plasmón a 525nm (Figura 22) lo que permite demostrar la formación de nanopartículas de oro con diámetro $DAuNp \cong 7nm$, tamaño supuesto de acuerdo a resultados similares reportados en la literatura [64].

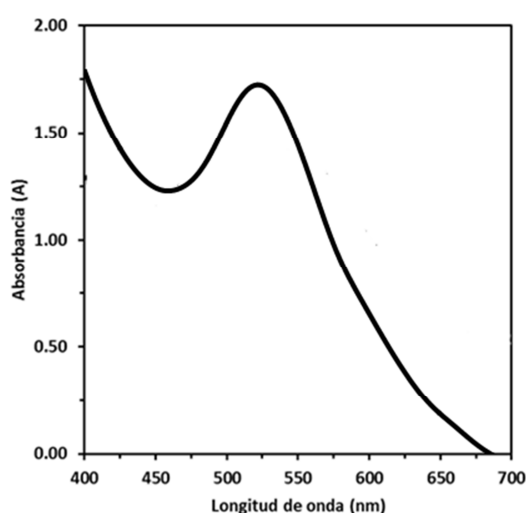
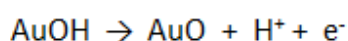
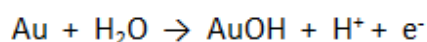


Figura 22. Espectro de absorción UV-Vis obtenido para agua deionizada conteniendo AuNp@cisteamina a 25°C.

La correcta adsorción del oro sobre el GCE es demostrada por los procesos redox de la formación de AuO a través del mecanismo de Reacción 4 [68]. La Figura 23 muestra el voltamperograma obtenido para un GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM en H_2SO_4 0.5 M, observándose los picos redox correspondientes a dicho mecanismo.



Reacción 4. Mecanismo de reacción que explica la electro-formación de AuO

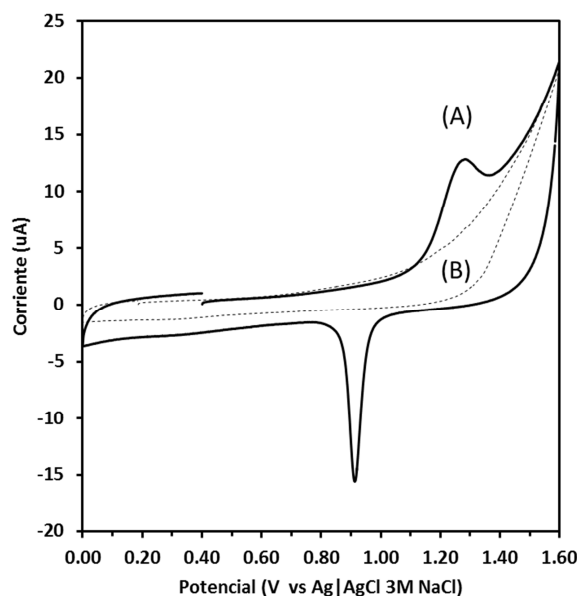


Figura 23. Respuesta voltamperometrica obtenida para (A) GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM y (B) GCE, en 0.5 M H₂SO₄ a 40 mV s⁻¹.

En complemento a estos resultados, y mediante un microscopio Raman (DXR Thermo Scientific, objetivo 10X, apertura 50 μ m) equipado con un láser de 14 mW que emite a 780 ± 0.2 nm, se obtuvo el espectro de la cisteamina pura (Fig. 24-*i*) y se comparó con el espectro del sistema GCE/AuNp@cisteamina (Fig. 24-*ii*) con el fin de evaluar los diferentes modos de vibración de los enlaces S-H y NH₃⁺. El de la cisteamina pura (Fig. 24-*i*) muestra a 2510 cm⁻¹ el estiramiento del enlace S-H, a 2935 cm⁻¹ el estiramiento del enlace C-H y a 3000 cm⁻¹ el estiramiento asimétrico del grupo CH₂, los cuales corresponden a los reportados en la literatura [64]. Adicionalmente, los diferentes modos de doblamiento del NH₃⁺ se observan entre 1000-1600 cm⁻¹. Comparando estas señales contra el sistema GCE/AuNp@cisteamina (Fig. 25-*ii*), puede observarse la disminución y casi desaparición del pico correspondiente a la vibración S-H, sugiriendo una interacción covalente entre el azufre de la cisteamina y el oro nanoparticulado; en el mismo espectro se observan señales a 1300 y 1580 cm⁻¹, correspondientes a los enlaces sp² del carbón vítreo [71].

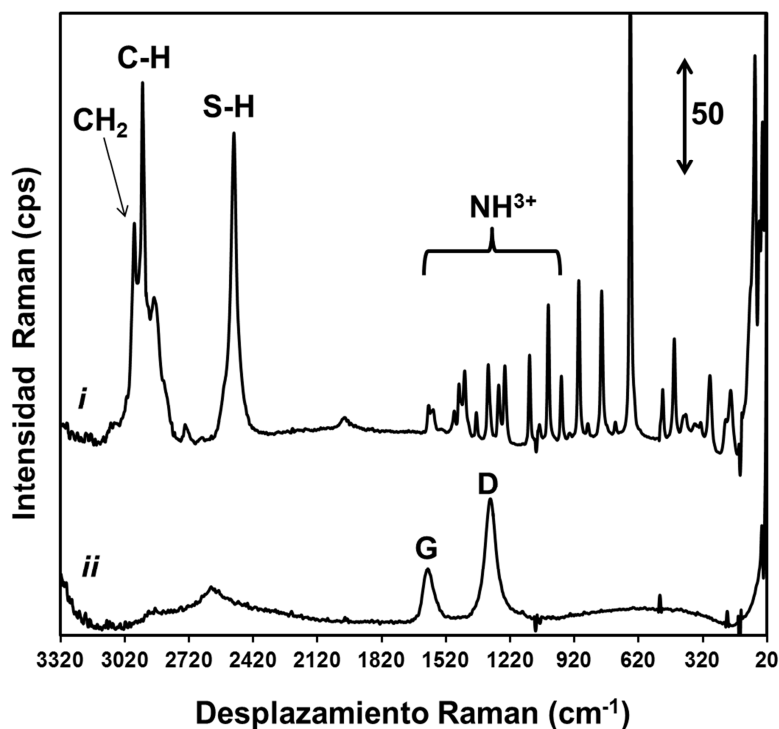


Figura 24. Espectros Raman de cisteamina pura (i) y GCE/AuNp@cisteamina (ii). (G) y (D) son las vibraciones referidas a los enlaces sp^2 del carbono del GCE.

Acto seguido mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés, Fourier transform infrared) se obtuvieron los espectros de los sistemas GCE (Fig. 25-i), GCE/AuNp@cisteamina (Fig. 25-ii) y GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM (Fig. 25-iii) mediante un espectrómetro Thermo-Nicolet Nexus FT-IR equipado con accesorio de reflectancia especular (ángulo 30°). Comparando el espectro del sistema GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM contra el GCE desnudo y GCE/AuNp@cisteamina, se observa un pico (Pico 1, Figura 25-iii) a 1730 cm^{-1} , el cual es atribuido a la vibración por estiramiento del enlace C=O de los grupos carboxilo localizados en la periferia del material dendrítico, demostrando que el sistema fue químicamente modificado por dendrimeros [69].

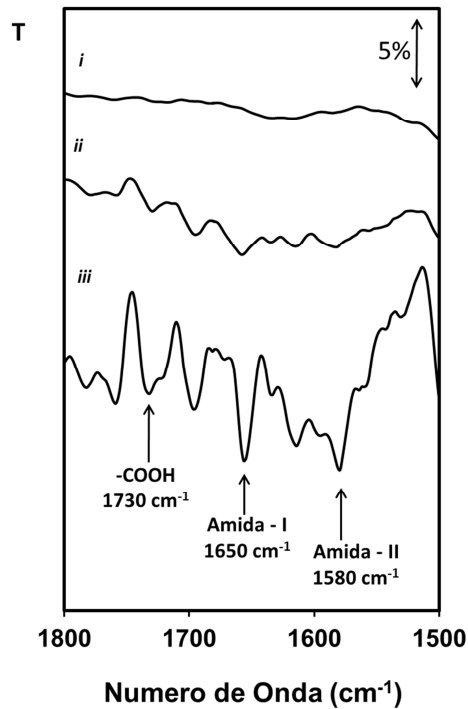


Figura 25. Espectro FT-IR obtenido para GCE (*i*); GCE/AuNp@cisteamina (*ii*) y GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM (*iii*) a 25°C.

Una comparación más detallada entre las figuras 25-ii y 25-iii, demuestra señales de respuesta más intensas para vibraciones atribuibles a los enlaces amida-I a 1650 cm^{-1} (Pico 2, Figura 25-iii) y amida-II a 1580 cm^{-1} (Pico 3, Figura 25-iii) en el sistema GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM [70].

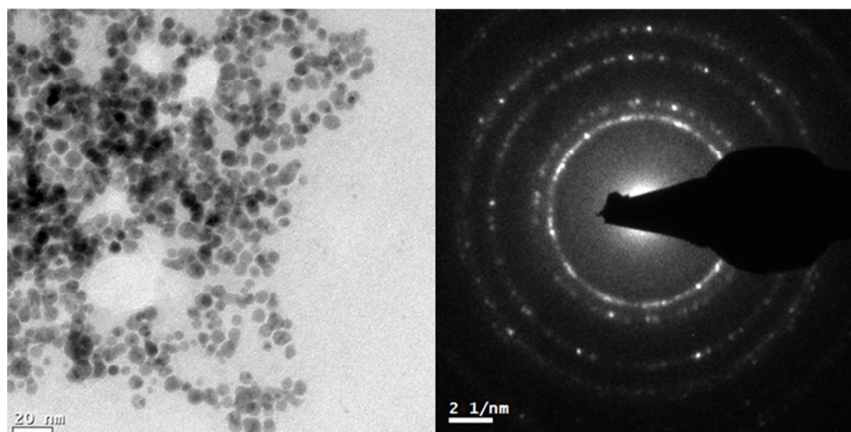


Figura 26. Imagen TEM y el patrón de difracción de electrones de las AuNp@cisteamina. (izq.) Imagen TEM que muestra la morfología de los cristales de oro. (der) patrón de difracción de electrones

Además, mediante el microscopio electrónico de transmisión (TEM, FEI-Titán G2 80-300 con resolución de 0.7Å) se obtuvieron micrografías las AuNp@cisteamina en sobre una rejilla de Cu (Figura 26), para las cuales se encontró un tamaño de partícula de 7.09 ± 1.75 nm de acuerdo al análisis de distribución de tamaño obtenido (Figura 27).

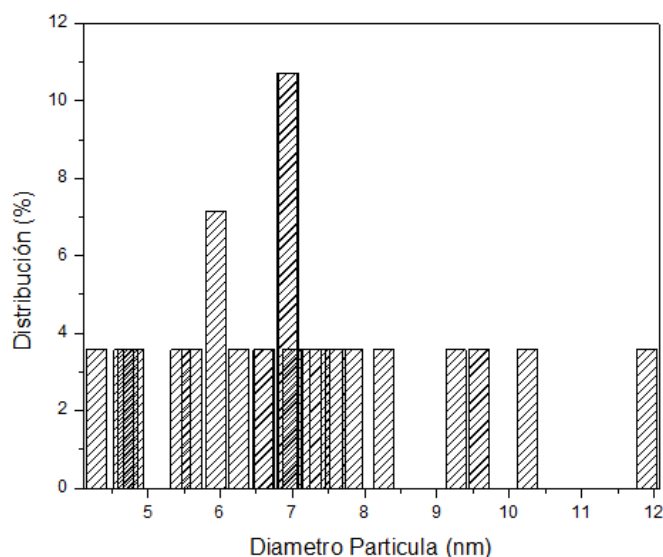


Figura 27. Histograma que muestra la distribución del tamaño de partícula de las AuNps@cisteamina

En este contexto, se determinaron los planos cristalográficos a los que se asocian los patrones de difracción de la figura 26, esto de acuerdo a los resultados reportados en la literatura, obteniendo planos cristalográficos [111], [200],[220] y [311] (Tabla 6) [72,73].

	2R (1/nm)	R (1/nm)	d (nm)	d (Armstrong)	Teóricos (Armstrong)	Planos	REFERENCIA
Primer anillo	8.455	4.2275	0.23654642	2.365464222	2.366	[111]	72
Segundo anillo	9.914	4.957	0.20173492	2.017349203	2.017	[200]	72
Tercer anillo	14.029	7.0145	0.14256184	1.425618362	1.443	[220]	72
Cuarto anillo	16.386	8.193	0.12205541	1.220554132	1.22	[311]	73

Tabla 6. Análisis de los patrones de difracción de las AuNps@cisteamina

2 Evaluación de muestras sintéticas de ácido úrico para construcción de curva de calibración.

2.1 GCEs modificados con AuNp@cisteamina/PAMAM

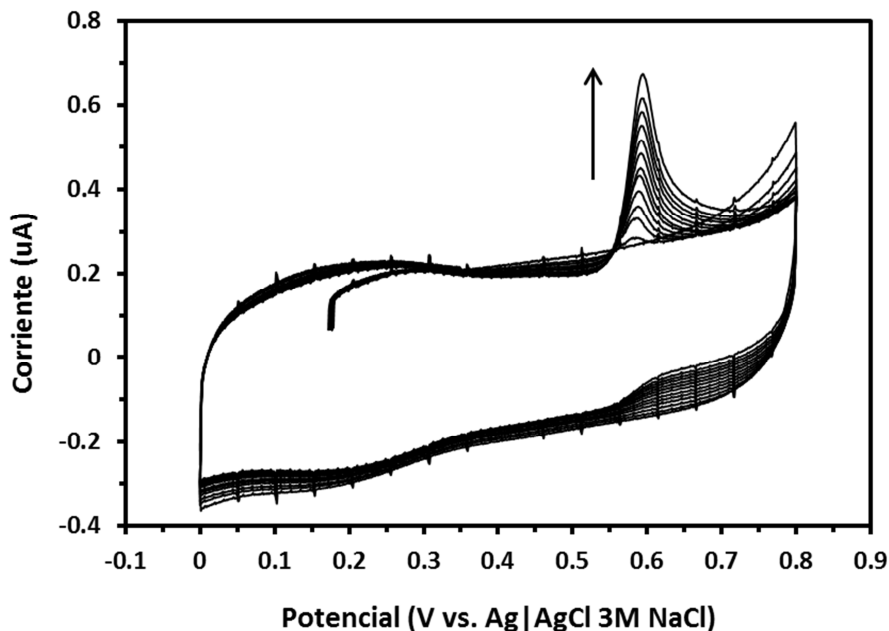


Figura 28. Respuestas voltamperométricas obtenidas para la oxidación de AU a 0.58V en GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM en PBS-pH2 ($I=0.1$). Las concentraciones de AU fueron incrementadas sucesivamente de la siguiente manera: 0, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, 0.20, 0.22 and 0.25 $\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$. Todos los experimentos se llevaron a cabo a $40\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ y 25°C .

Los GCEs modificados con AuNp@cisteamina/PAMAM se usaron para obtener respuestas voltamperométricas de concentraciones conocidas de AU que fueron preparadas por diluciones de una disolución stock de ácido úrico $100\ \mu\text{M}$ en una celda electroquímica con 5 mL de buffer de fosfatos pH 2 (PBS-pH2, fuerza iónica=0.1).

La Figura 28 muestra los picos de oxidación a diferentes concentraciones conocidas, el valor de corriente de pico se midió en 0.58 V. Para poder demostrar el efecto electrocatalítico del sistema modificador (AuNp@cisteamina/PAMAM), este mismo protocolo experimental se aplicó a un GCE sin modificar (desnudo).

2.2 GCE desnudo.

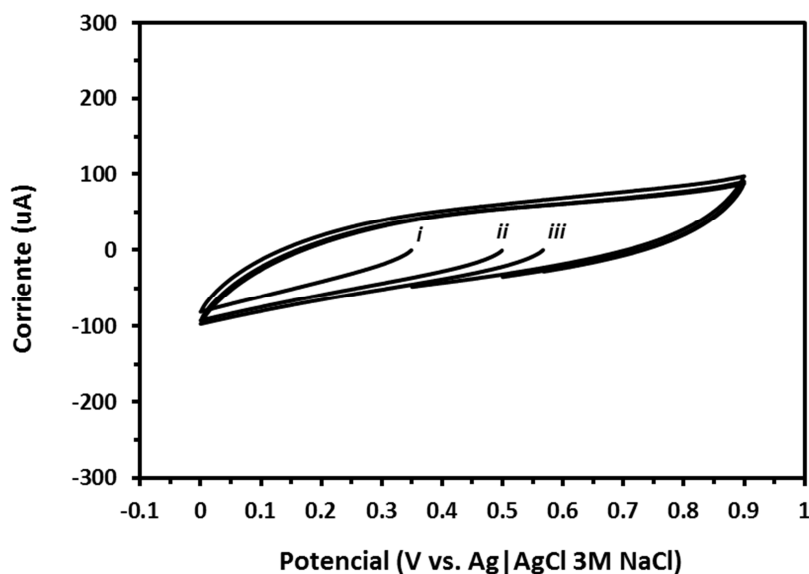


Figura 29. Respuestas voltamperometricas obtenidas para GCE en PBS-pH2 ($I=0.1$) + Au a (i) 0, (ii) 0.03 y (iii) 0.25mg-dL⁻¹

En la Figura 29, se muestra que no existe respuesta electroquímica para la oxidación del AU en un GCE desnudo, demostrando que esta se promueve por el recubrimiento AuNp@cisteamina, gracias al efecto electrocatalítico de las AuNps en la oxidación del AU. Sin embargo no es suficiente para demostrar los efectos de preconcentración que aportaron los dendrimeros, y que fueron planteados en la hipótesis. Por esta razón se realizó un experimento de control donde el GCE fue modificado únicamente con nanopartículas de oro sin ningún recubrimiento adicional (AuP).

2.3 GCE modificado con nanopartículas de oro vía electrodeposito.

Las AuP fueron depositadas en GCEs usando la técnica de doble pulso de potencial (DPP) [74]. Los experimentos se desarrollaron usando una disolución acuosa de 1M KNO₃ + 1M HCl + 7.2mM HAuCl₄. En este sentido, se empleó un pulso de nucleación (E_{nuc}) de 0.35V que fue aplicado por 50ms, inmediatamente seguido por un pulso de crecimiento (E_{growth}) de 0.50V por 10s. Ambos potenciales fueron previamente determinados por voltamperometría cíclica (CV) (Figura 30).

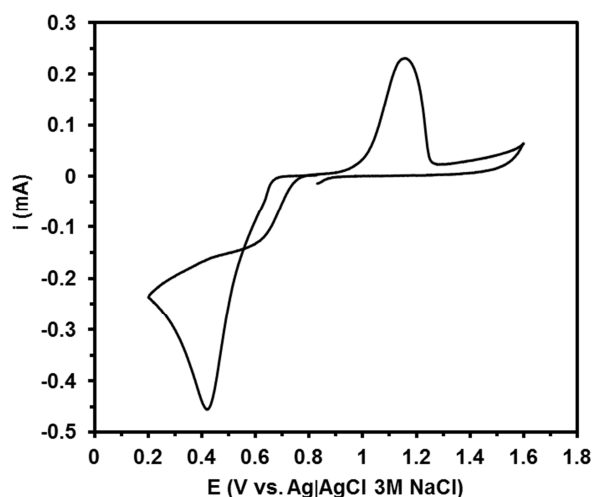


Figura 30. CV obtenido para el electrodeposición de AuP en GCEs. Los picos observados a 0.42 and 1.20V corresponden al depósito y redisolución de AuPs respectivamente. La velocidad de barrido es de $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$

El efecto electrocatalítico de las AuNps se demuestra al obtener las respuestas voltamperometricas para la oxidación del AU con GCEs modificados con nanopartículas de oro vía electrodeposito (AuPs) (Fig. 31) y compararlas con los GCEs desnudos y los GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM.

La oxidación del AU en GCE/AuP ocurre aproximadamente a 0.75 V, mientras que en el GCE desnudo este proceso no se observa. Este resultado demuestra claramente las nanopartículas de oro son las responsables del efecto electrocatalítico en el sistema GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM, mientras que los dendrimeros PAMAM, otorgan un efecto de preconcentración que se refleja en el aumento de las respuestas de corriente para una misma concentración. Este punto se elucida en la siguiente sección mediante el normalizado y comparación de corrientes.

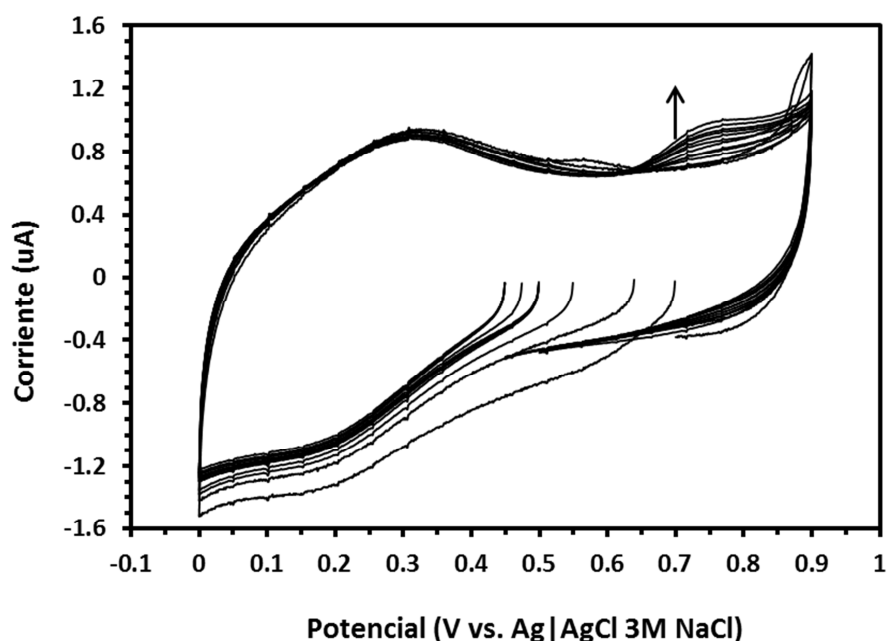


Figura 31 Respuestas voltamperometricas obtenidas a 0.75V con GCE/AuP en PBS-pH2 ($I=0.1$). Las concentraciones de AU fueron incrementadas sucesivamente de la siguiente manera: 0, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, 0.20, 0.22 and $0.25 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$. Todos los experimentos se llevaron a cabo a $40\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ y 25°C .

3. GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM vs. GCE/AuP

La Figura 32 muestra una comparación entre las corrientes de oxidación de AU obtenidas en GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM y GCE/AuP ambos en PBS-pH2 ($I=0.1$). Ambas corrientes de oxidación están normalizadas (El cálculo del área electroactiva de los GCEs se presenta en el Anexo). La Figura 32 demuestra que la preconcentración interfacial de AU es claramente significativa cuando las concentraciones de AU son pequeñas ($0.03\text{-}0.12\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$), demostrando que las micelas dendríticas promueven la preconcentración de las moléculas de AU en la proximidad de las AuNps@cisteamina cuando su potencial electroquímico es pequeño. En cambio, cuando la concentración de AU es mayor ($0.12\text{-}0.25\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$), el fenómeno de preconcentración no es necesario, demostrando que las moléculas de AU adquieren suficiente potencial electroquímico para acercarse a las AuNps@cisteamina por sí mismas. Los cálculos de área electroactiva para normalización de las corrientes se presentan en el anexo 2.

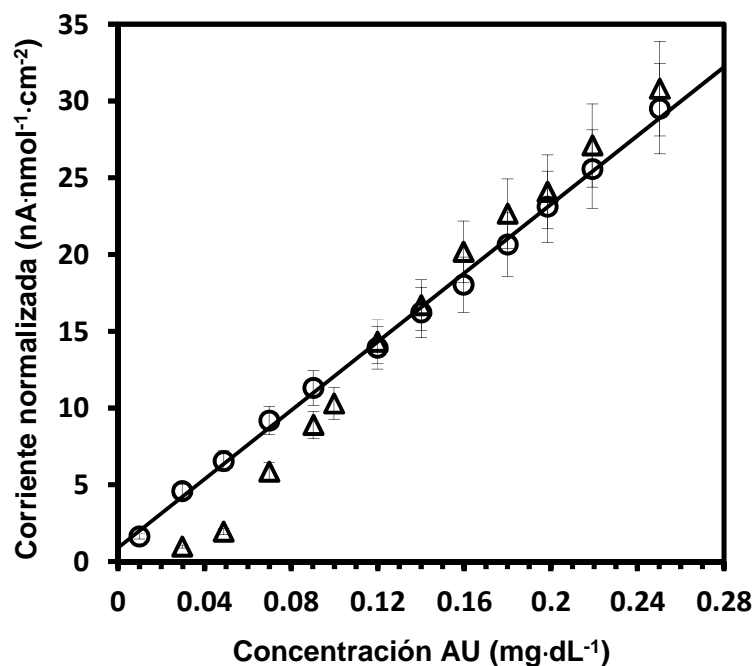


Figura 32. Comparación entre corrientes de oxidación de AU obtenidas en GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM (O) y GCE/AuP (Δ) en PBS-pH2 (I=0.1).

4 Evaluación de muestras de suero sanguíneo con el sistema GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM.

Muestra	[AU] _{ENZ} (mg/dL)	[AU] _{EQ} (mg/dL)	% Desviación
A	ciego	4.74	-
B	3.7	3.66	-1.1
C	3.36	3.61	6.9

Tabla 7. Comparación de concentraciones de AU medidas por método enzimático y electroquímico.

Con el fin de demostrar el funcionamiento del sistema GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM, se analizaron muestras reales de pacientes con PE (Figura 33). En la Tabla 7, se comparan los resultados obtenidos contra el método enzimático (ENZ) (El método enzimático fue desarrollado por el instituto nacional de perinatología siguiendo las condiciones reportadas en la literatura [5]), encontrándose variaciones menores al 10% que no son significativas desde el punto de vista práctico.

Asimismo, este resultado indica que la contribución de los efectos de matriz debe ser muy pequeña.

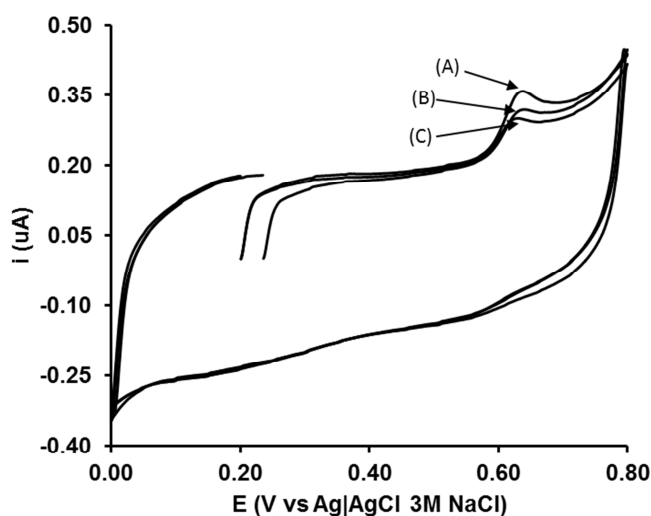


Figura 33. Respuestas voltamperométricas obtenidas para la oxidación de muestras de AU a 0.62 V en GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM en PBS-pH2 ($I=0.1$). Todos los experimentos se llevaron a cabo a $40\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ y 25°C .

Sin embargo, utilizar el método de CV para el análisis de muestras reales, implica ciertas desventajas, de mucha importancia práctica tales como: el método requiere que se analice un blanco, la línea base asociada a la construcción de la curva de calibración puede variar de una a otra medición, el método asume que la conductividad eléctrica del sustrato de electrodo (GC) es constante, el método asume que la capa modificadora a base de AuNps@cisteamina y dendrímeros PAMAM del electrodo no tiene cambios estructurales.

Por tales motivos, utilizar un método que elimine estas desventajas es una clara área de oportunidad. En el sistema GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM en PBS-pH2 ($I=0.1$), se aplicaron 0.64 V durante un experimento amperométrico (Figura 34A) donde fueron adicionadas sucesivamente concentraciones de AU conocidas con el fin de obtener una nueva curva de calibración para el sistema (Figura 34B).

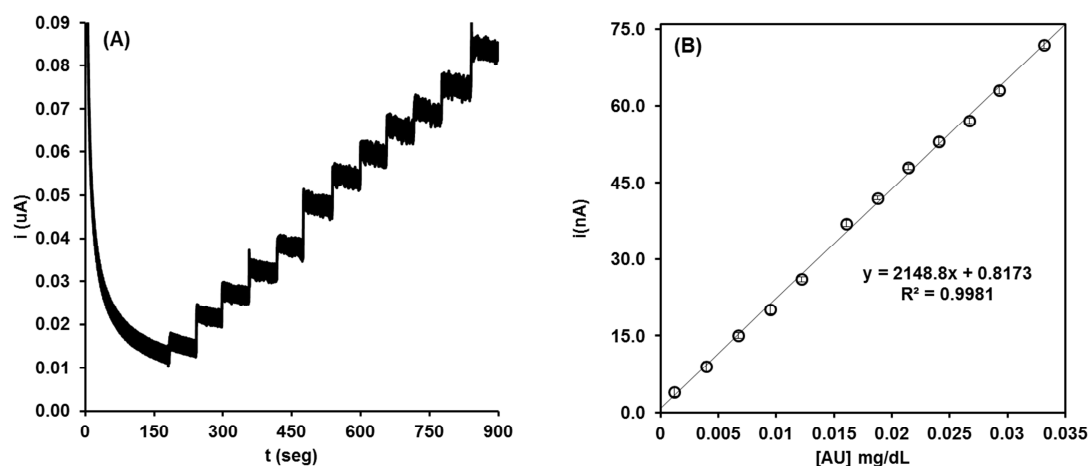


Figura 34. (A) En GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM en PBS-pH2 ($I=0.1$), se aplicaron 0.64 V y las concentraciones de AU fueron adicionadas sucesivamente de la siguiente manera: 0, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, 0.20, 0.22 y 0.25 $\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$, (B) Curva de calibración del sistema GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM.

Para demostrar el funcionamiento de la técnica con el sistema GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM, se analizaron muestras reales de pacientes con diagnóstico previo de PE (Figura 35). En la Tabla 8, se comparan los resultados obtenidos contra el método enzimático sin encontrarse variaciones significativas.

Muestra	[AU] _{ENZ} (mg/dL)	[AU] _{EQ} (mg/dL)	% Desviación
A	2.6	2.9	11
B	2.7	2.7	0
C	2.6	2.9	11

Tabla 8. Comparación de concentraciones de AU medidas por método enzimático y electroquímico.

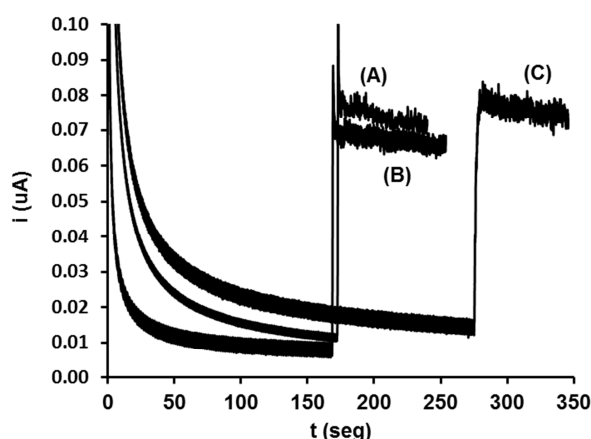


Figura 35. Respuestas amperometricas obtenidas para la oxidación de 3 muestras de suero sanguíneo con concentraciones distintas. Las corrientes fueron medidas en 0.64V vs (Ag|AgCl 3M NaCl) en GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM en PBS-pH2 (I=0.1). Todos los experimentos se llevaron a cabo a 25°C.

5. Método de adición de estándar del GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM.

Para poder evaluar la selectividad del sistema, se analizaron concentraciones de muestras estándar por el método analítico de adición de estándar (Anexo 1) [75]. En la Figura 36 se comparan las curvas de calibración del método de adición de estándar contra el amperométrico, donde puede observarse que la diferencia de pendientes entre ambas es no significativa e indica que la selectividad es muy cercana a 1.

$$\text{Selectividad} = \frac{m_{\text{adstd}}}{m_{\text{CC}}}$$

$$\text{Selectividad} = \frac{2462.7}{2160.4} = 1.14$$

En base a lo anterior, concluimos que el método de adición de estándar para el análisis de muestras de reales de AU, presenta ventajas contra la CV, amperometría e incluso el método enzimático, ya que normaliza el método sin efectos de matriz y de sustrato, no requiere almacenaje estricto de reactivos, requiere solo 5µL de suero sanguíneo para el análisis y el tiempo de respuesta no es mayor a 10 minutos (Anexo 1).

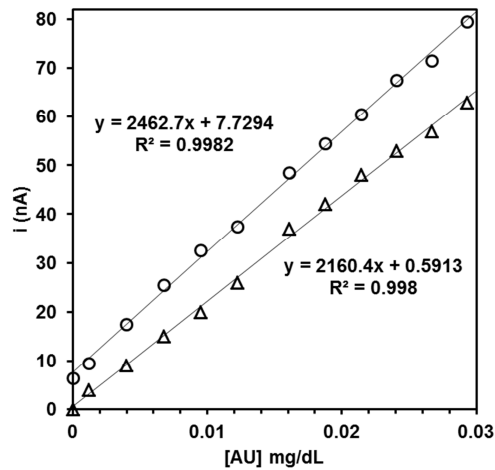


Figura 36. Comparación entre corrientes de oxidación de AU obtenidas por adición de estándar (O) y amperometría (Δ) en PBS-pH2 (I=0.1).

Para dar validez a estos argumentos, se analizaron muestras de suero sanguíneo de pacientes con PE mediante el método de adición de estándar. Los experimentos fueron realizados en un potenciostato Ivium pocketstat (Figura 37), para demostrar la portabilidad del sistema. En la Tabla 9, se comparan los resultados obtenidos contra el método enzimático (análisis realizados en el Instituto Nacional de Perinatología (INPER)) sin encontrar diferencias significativas.



Figura 37. Potenciostato portable marca Ivium, modelo pocketstat, tamaño: 115.2 x 58.5 x 12.5mm, peso: 140 g, tamaño: 115.2 x 58.5 x 12.5mm, ventana de potencial: ±4V / ±10mA, impedancia de entrada ≥ 1TΩ, resolución ± 10mV.

Paciente	[AU] _{ENZ} (mg/dL)	[AU] _{EQ} (mg/dL)	% Desviación
1	5.6	5.80	-4
2	9.2	10.20	-11
3	7.0	7.00	0
4	3.7	3.40	8
5	5.9	5.40	8
6	3.5	3.20	9
7	4.9	4.50	8
8	3.4	3.60	-7
9	2.6	2.90	-12
10	5.4	5.20	4
11	5.9	5.90	0
12	5.5	5.20	5
13	4.9	4.80	2
14	3.6	3.60	0
15	4.1	4.60	-12
16	5.9	5.30	11
17	6.3	5.80	8
18	3.9	2.80	28
19	4.4	4.90	-11
20	7.3	7.20	1
21	3.5	3.90	-11
22	6.6	5.90	11
23	6.4	6.90	-8
24	7.3	7.50	-3
25	2.5	2.3	8

Tabla 9. Comparación de concentraciones de AU de pacientes con PE, medidas por método enzimático y electroquímico de adición de estándar.

Sección 6: Conclusiones.

Se lograron modificar electrodos de carbón vítreo con nanopartículas de oro recubiertas con cisteamina y dendrímeros de poliamidoamina generación 4.5 para la detección amperométrica altamente selectiva de ácido úrico en suero sanguíneo humano.

El efecto electrocatalítico de las nanopartículas de oro se demostró mediante la oxidación de ácido úrico en electrodos de carbón vítreo modificados con nanopartículas de oro, disminuyendo los efectos de dispersión de la corriente en los electrodos de carbón vítreo.

La preconcentración de ácido úrico en la interfase electrodo|electrolito es promovida por la asociación química de los dendrímeros de poli(amidomina) a las nanopartículas de oro.

Los efectos de matriz son minimizados por los dendrímeros de poli(amidoamina) confinados en el sustrato modificado ya que estos poseen una buena cantidad de grupos carboxilo por unidad dendrítica, por lo que el método amperométrico por adición de estándar es aplicable con cualquier lote de electrodos de carbón vítreo.

Las concentraciones de ácido úrico determinadas por el método amperométrico de adición de estándar muestran diferencias mínimas respecto a los resultados obtenidos vía método enzimático, pero presenta ventajas superiores en cuanto al tiempo de respuesta y pretratamiento de las muestras, además de que los ensayos de laboratorio son muy costosos, tediosos e incluso generan riesgos para los operarios del equipo clínico. En este contexto, los detectores electroquímicos son una propuesta atractiva por su alta portabilidad, fácil operatividad, menor costo y seguridad.

Sección 7: Perspectivas.

Modificación de electrodos serigrafados con nanopartículas y su aplicación en el análisis de metabolitos.

En el presente trabajo se analizaron muestras de pacientes con preeclampsia, padecimiento que como bien se explicó, está asociado al exceso de UA. Sin embargo, la falta o el exceso de ciertas biomoléculas en las rutas metabólicas de los seres humanos, están asociadas a muchos otros casos donde biomoléculas son usadas como biomarcadores.

La galactosemia es un trastorno hereditario, si ambos padres portan un gen anormal que cause esta enfermedad, cada uno de sus hijos tiene un 25% de probabilidades de resultar afectado. Existen 3 formas de la enfermedad: deficiencia de galactosa-1-fosfatouridil transferasa (galactosemia clásica, la forma más común y la más grave), deficiencia de galactosa cinasa y deficiencia de galactosa-6-fosfato epimerasa. Las personas con galactosemia son incapaces de descomponer completamente el azúcar simple galactosa, que compone la mitad de la lactosa, el azúcar que se encuentra en la leche. El otro azúcar es la glucosa. Si a un bebé con galactosemia se le da leche, los derivados de la galactosa se acumulan en el organismo del bebé. Estas sustancias dañan el hígado, el cerebro, los riñones y los ojos. Las personas con galactosemia no pueden tolerar ninguna forma de leche (ni humana ni animal) y deben ser cuidadosos al consumir otros alimentos que contengan galactosa. Si se recibe un diagnóstico temprano y se evitan estrictamente los productos lácteos se puede llevar una vida relativamente normal [75].

En este sentido, se probaron los materiales nanometricos en el desarrollo de detectores electroquímicos de galactosa (GAL), galactosa 1-fosfato (GAL-1P) y galactosa-6-fosfato epimerasa (UDP).

El objetivo principal fue modificar superficies de electrodos serigrafados de gota de carbón (SPEC, por sus siglas en inglés) con nanopartículas de plata (AgNp), mediante la técnica de doble pulso de potencial, con el fin de aumentar la actividad electrocatalítica y disminuir los efectos de dispersión de la corriente en la detección de las biomoléculas mencionadas [74].

Para la modificación de los SPEC con AgNp se preparó una disolución de 1 mM AgNO_3 con KNO_3 0.1M como electrolito soporte y se montó una celda electroquímica de 3 electrodos, donde un electrodo serigrafiado de carbón y un alambre de platino fueron usados como electrodo de trabajo y contra electrodo respectivamente, mientras que un electrodo $\text{Ag}|\text{AgCl}$ (3M NaCl) operó como referencia. Los experimentos fueron realizados utilizando un potenciostato autolab PGSTAT 12

La Figura 38, muestra la respuesta obtenida para la electrodeposición de AgP con cuatro distintos electrodos.

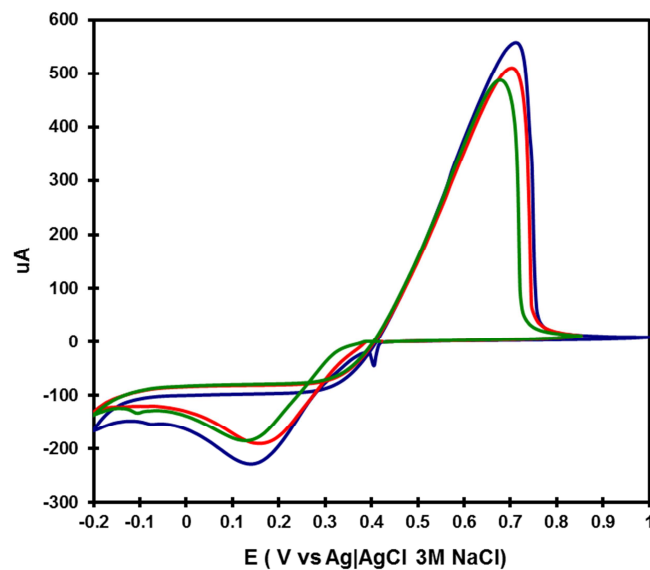


Figura 38. CVs obtenidos para la electrodeposición de AgNp en electrodos de gota de carbón. Barrido de potencial igual a $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

En este sentido, fue aplicado un pulso de nucleación (E_N) de 0.05V inmediatamente seguido por un pulso de crecimiento (E_G) de 0.2V, con un tiempo de nucleación de 50ms y un tiempo de crecimiento de 10s.

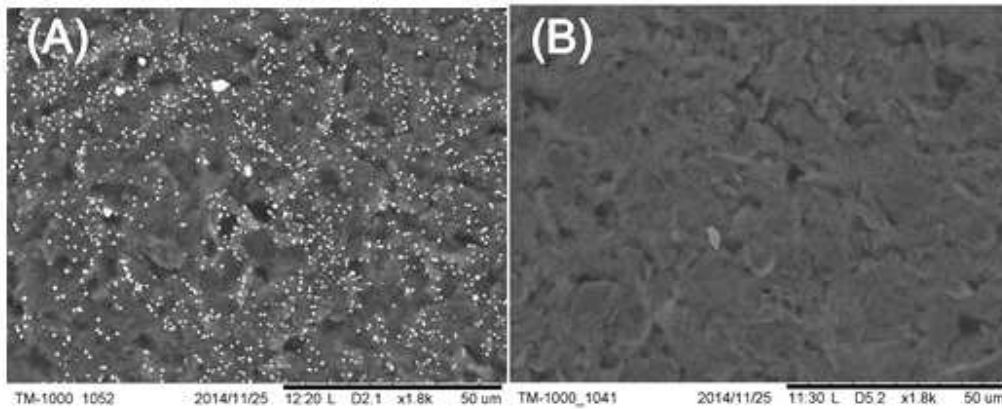


Figura 39. Micrografías SEM de sistemas (A)SPEC/AgNp y (B)SPEC

Por otro lado, la caracterización de las AgNp se llevó a cabo en un microscopio electrónico de barrido (SEM) Hitachi Tabletop TM-1000 ($V_{acc}=15.0kV$, $Mag=500x$), la Figura 39A muestra los depósitos de plata sobre la superficie de carbón para un tiempo de nucleación de 50ms y 10s de crecimiento, contra una superficie de carbón sin modificar (Figura 39B).

Siguiendo la metodología anteriormente descrita, se modificaron con AgNp, electrodos de gota para analizar GAL (100 μM), GAL-1P (100 μM) y UDP (100 μM). El experimento electroquímico se llevó a cabo mediante voltamperometría lineal en sentido anódico con el fin de oxidar las especies. Los resultados se muestran en la Figura 40.

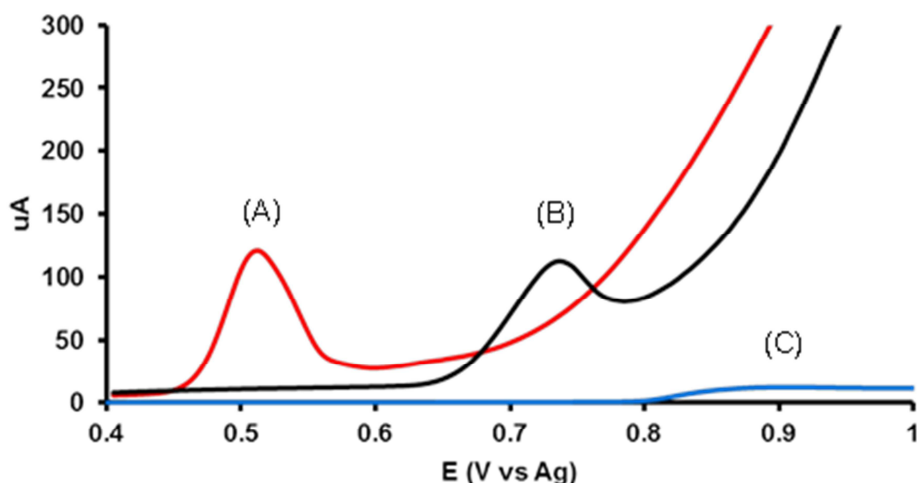


Figura 40. Respuestas obtenidas para la oxidación galactosa 1-fosfato (A), UDP (B) y de galactosa (C).

De este estudio se concluye que existe un efecto electrocatalítico de las nanopartículas de plata, el cual ha sido demostrado por las respuestas voltamperométricas de la oxidación de GAL, GAL 1-p y UDP (los electrodos desnudos no presentaron respuesta respecto a estos analitos), quedando pendiente la evaluación del mecanismo de reacción y si existe una relación de la electroactividad con las estructuras químicas de los analitos

Así pues, se propone como una perspectiva del presente proyecto, aprovechar el efecto electrocatalítico de los materiales nanométricos para la funcionalización de diversos materiales de electrodo que puedan ser utilizados como detectores electroquímicos o biosensores, lo anterior mediante la continuación del estudio, desarrollo y aplicación de la técnica de doble pulso de potencial para el depósito de materiales nanométricos.

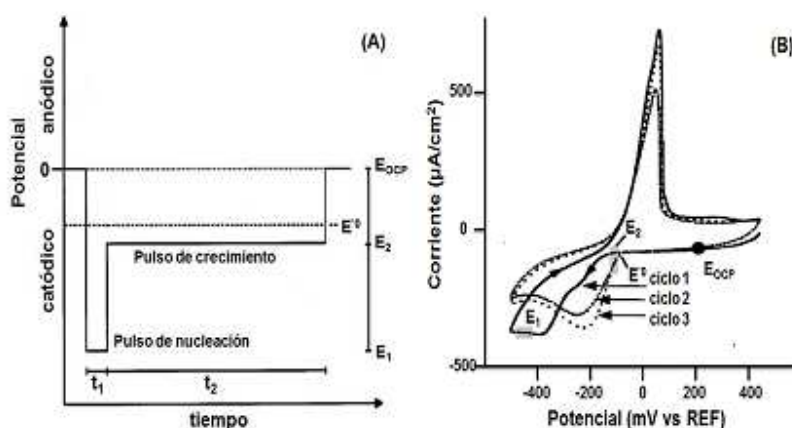


Figura 41. A) Esquema de potenciales y tiempos involucrados en la técnica de doble-pulso de potencial, y B) voltamperograma típico para un electrodepósito metálico donde se remarcan los potenciales necesarios en la técnica de doble-pulso de potencial. Se muestran tres ciclos de barrido de potencial, tomada y modificada de [77]

En la figura 41B, se muestran los parámetros termodinámicos que se involucran en esta técnica, donde en primera instancia es necesario determinar un pulso de potencial catódico (E_1) ubicado en la zona de control faradaico con la intención de promover la nucleación en un periodo de tiempo (t_1) muy corto (en el orden de ms) y posteriormente se determina un segundo pulso de potencial catódico (E_2) ubicado en la zona de control cinético que permita regular el crecimiento de los núcleos en un periodo de tiempo (t_2) largo (en el orden de segundos) [77].

Estos parámetros pueden obtenerse mediante otra técnica electroquímica como la voltamperometría cíclica, del cual podremos analizar los siguiente: potencial a circuito abierto (E_{ocp}), potencial termodinámico estándar (E^0), potencial de nucleación (E_1) y potencial de crecimiento (E_2) [77].

El empleo de esta técnica, permite depósitos de metales en condiciones de no apareamiento (situación en la que cada partícula metálica crece a una velocidad que es independiente del número y proximidad de otras partículas vecinas (Figura 42), ya que la nucleación es instantánea o independiente del tiempo, debido a que el proceso ocurre en la zona de control por transferencia de masa (independiente del tiempo).

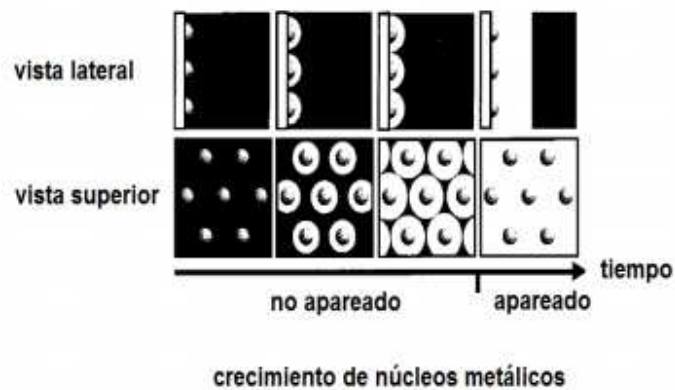


Figura 42. Relación espacial del crecimiento de núcleos metálicos, tomada y modificada de [77].

En contraste el crecimiento de los núcleos recién formados (Figura 43) debe ser controlado cinéticamente para evitar el fenómeno de apareamiento. De lo contrario, la dispersión del tamaño de partícula recién creada durante el proceso de nucleación sería independiente del tiempo de crecimiento, pudiendo acabar rápidamente en el apareamiento de partículas [78].

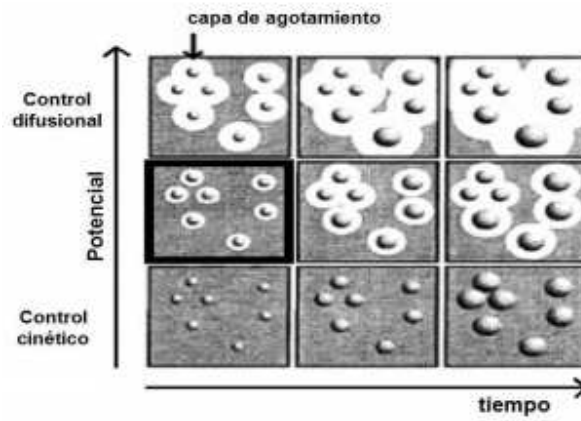


Figura 43. Efecto del potencial sobre la dispersión de tamaños de partícula metálicas como función del tiempo. La situación ideal para un crecimiento sin apareamiento se remarca con el cuadro de líneas más gruesas [78].

Anexo 1. Desarrollo experimental y matemático para la determinación de la concentración de ácido úrico mediante el método electroquímico de adición de estándar.

El método de adición de estándar es especialmente útil para analizar muestras complejas en las que la probabilidad de que se produzcan efectos de matriz es considerable. En la mayoría de las versiones del método de la adición de estándar, la matriz de la muestra es casi idéntica después de cada adición y la única diferencia es la concentración de analito o la concentración de reactivo en el caso de que se añada un exceso de un reactivo analítico [75].

En este trabajo, el método de adición de estándar fue aplicado para medir la concentración de ácido úrico en una muestra (C_X) evaluando la variación de corriente producida por la adición de varias alícuotas idénticas (V_{AD}) de una disolución estándar de ácido úrico (C_{STD}).

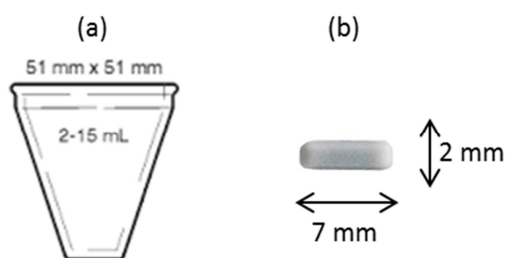


Figura 44. Elementos del arreglo experimental para evaluación de AU en muestras de suero sanguíneo: (a) Celda electroquímica marca Bas, (b) Agitador magnético recubierto de teflón.

En una celda electroquímica como la que se muestra en la Figura 44, se adiciono un volumen (V_s) de 2 mL de PBS-pH2 ($I=0.1$). La celda se montó en una parrilla de agitación donde un agitador magnético recubierto con teflón como el de la Figura 44 se giró a una velocidad aproximada de 240 RPM. La celda se conectó a un potenciostato Ivium Pocket Stat, donde un alambre de Pt fue usado como electrodo contador y los potenciales referenciados a un electrodo de $Ag|AgCl$ (3M NaCl), mientras que el electrodo de trabajo fue el sistema GCE/AuNp@cisteamina/PAMAM. En un experimento cronoamperometrico y aplicando un potencial de 0.64 V (potencial que se asegura la oxidación de AU de acuerdo a los experimentos voltamperometricos

realizados), se midió la caída de corriente producida por el cambio de potencial desde el equilibrio hasta la zona de control faradaico, es decir, una vez que se ha formado la capa de difusión (corriente constante), posterior a este paso, se añade un volumen de 5 μL de la muestra de suero sanguíneo a evaluar (V_x) y se da un lapso de tiempo suficiente para medir el aumento de corriente producido por el proceso de oxidación del AU sobre el sustrato modificado. Una vez que la corriente vuelve a ser constante, se añaden 5 alícuotas de 10 μL de disolución del estándar de AU de concentración 1 mg/dL, esperando entre cada una de estas adiciones la estabilización del aumento de corriente (Figura 45).

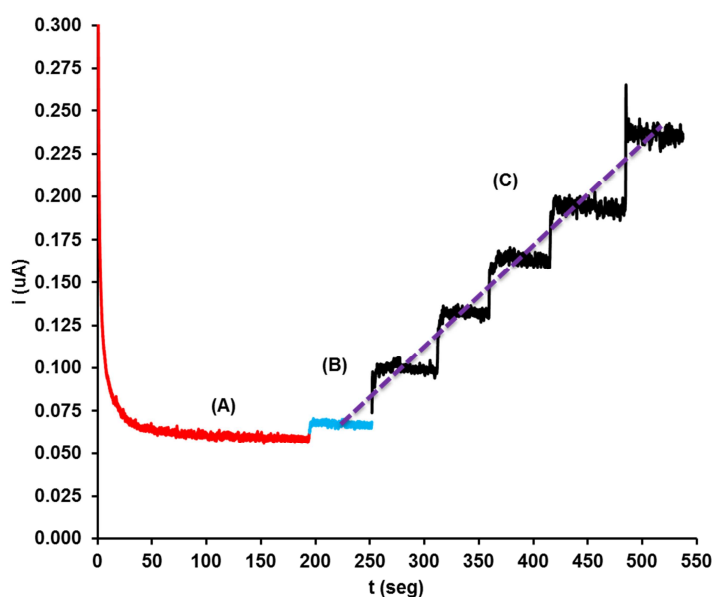


Figura 45. Amperograma obtenido en el análisis de una muestra de suero sanguíneo por adición de estándar, donde: (A) Zona de estabilización de la corriente del blanco (capa de difusión), (B) Adición de la muestra problema y (C) Adiciones de estándar.

Si la respuesta de corriente es proporcional a la concentración, como debe ser para que el método de adición de estándar sea aplicable, se puede escribir que:

$$i_X = k_X C_X \quad \text{Ecuación 1}$$

$$i_{\text{STD}} = k_{\text{STD}} C_{\text{AD}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde i es la corriente, k es una constante de proporcionalidad y C es la concentración de la muestra para los términos con subíndice x y para el estándar

aquellos con subíndice STD, C_{AD} es la concentración final por la adición de estándar. Así pues, totalizando la corriente del experimento, como i_T :

$$i_T = i_X + i_{STD} \quad \text{Ecuación 3}$$

Y sustituyendo las ecuaciones 1 y 2, en 3:

$$i_t = k_X C_X + k_{STD} C_{AD} \quad \text{Ecuación 4}$$

Ahora bien, si V_T es el volumen final de la celda al terminar el experimento y V_0 el volumen al inicio del mismo:

$$V_0 = V_S + V_X \quad \text{Ecuación 5}$$

$$V_T = V_S + V_X \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde V_S es el volumen del electrolito soporte, V_X el volumen de muestra, y V_{AD} el volumen de la adición de estándar. Como $V_X \ll V_S$, se puede considerar que $V_0 \approx V_S$. Si consideramos que en cada adición de estándar:

$$C_{STD} V_{AD} = C_{AD} V_T \quad \text{Ecuación 7}$$

$$C_{STD} V_{AD} = C_{AD} (V_0 + V_{AD}) \quad \text{Ecuación 8}$$

Y despejando la concentración añadida de estándar (C_{AD}):

$$C_{AD} = \frac{C_{STD} V_{AD}}{(V_0 + V_{AD})} \quad \text{Ecuación 9}$$

Y sustituyendo la ecuación 9 en la 4:

$$i_t = k_{STD} C_{STD} \left(\frac{V_{AD}}{(V_0 + V_{AD})} \right) + k_X C_X \quad \text{Ecuación 10}$$

Con los datos obtenidos en el experimento amperométrico, se construye una gráfica donde la ecuación 10 quede de la forma $y=mx+b$, donde $m=k_{STD} \cdot C_{STD}$ (Figura 46).

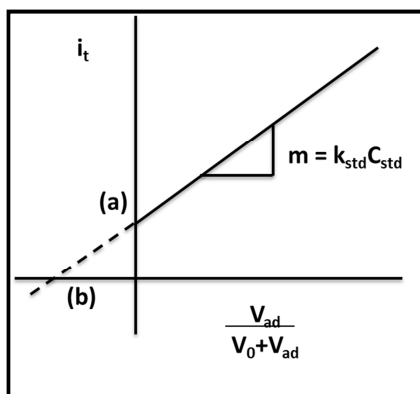


Figura 46. Representación gráfica de la recta de calibrado del método de adición de estándar. La concentración de la disolución problema se puede calcular por extrapolación como se denota por la línea punteada.

Así pues, cuando volumen de estándar que se ha añadido es cero ($V_{AD}=0$) (Figura 46 (a)):

$$i_t = k_X C_X \quad \text{Ecuación 11}$$

Y extrapolando la recta, cuando $i_T \rightarrow 0$ (Figura 46(b)):

$$0 = k_{STD} C_{STD} \left(\frac{V_{AD}}{(V_0 + V_{AD})} \right) + k_X C_X \quad \text{Ecuación 12}$$

Como sabemos que no existen efectos de matriz, se puede considerar que $k_{STD} = k_X = k$, quedando la ecuación 12 como:

$$k C_X = -k C_{STD} \left(\frac{V_{AD}}{(V_0 + V_{AD})} \right) \quad \text{Ecuación 13}$$

Eliminando las constantes en ambos lados de la ecuación:

$$C_X = -C_{STD} \left(\frac{V_{AD}}{(V_0 + V_{AD})} \right) \quad \text{Ecuación 14}$$

Así pues, la ecuación 14 es útil para la evaluación de la concentración de AU en suero sanguíneo, faltando solo multiplicar el resultado por 400, cifra que corresponde al factor de dilución de la muestra:

$$C_X = -C_{STD} \left(\frac{V_{AD}}{(V_0 + V_{AD})} \right) \times 400 \quad \text{Ecuación 15}$$

La Figura 47, muestra un ejemplo de una muestra problema evaluado por este método.

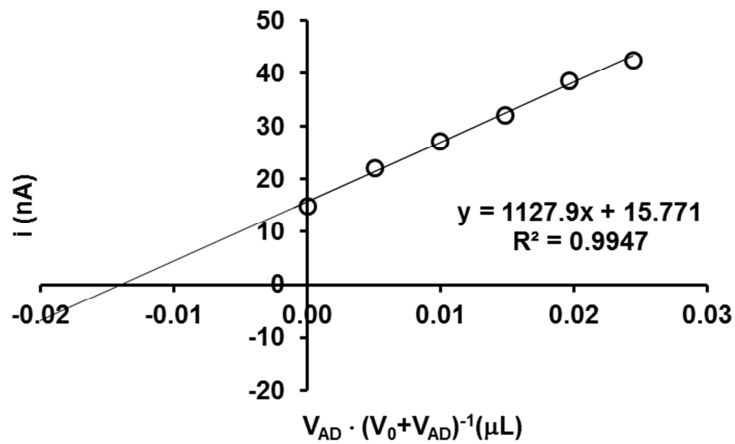


Figura 47. Datos del método de adición estándar para la determinación de AU en una muestra de suero sanguíneo.

El valor de la intersección de la recta con el eje x, puede calcularse despejando la abscisa de la ecuación o leerse geoméricamente. El valor numérico de esta intersección es -0.014, sustituyendo los valores en la ecuación 15:

$$C_X = -1 \frac{\text{mg}}{\text{dL}} (-0.014) \times 400$$

$$C_X = 5.6 \frac{\text{mg}}{\text{dL}}$$

Dicho valor puede compararse con el obtenido por el método enzimático colorimétrico (realizado en el instituto nacional de perinatología), sin encontrarse diferencias significativas:

$$C_{EQ} = 5.6 \frac{\text{mg}}{\text{dL}}$$

$$C_{ENZ} = 5.8 \frac{\text{mg}}{\text{dL}}$$

Anexo 2. Estimación del factor de rugosidad para electrodos de carbón vítreo.

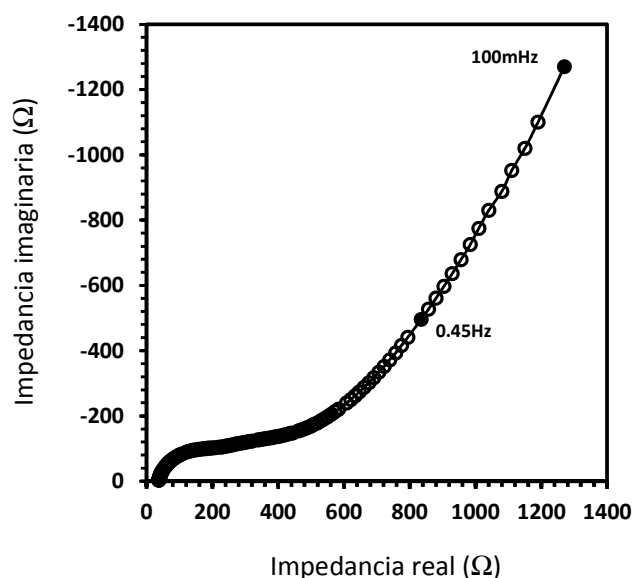


Figura 48. Espectro EIS obtenido para un GCE poroso, inmerso en NaF 0.9N a 25°C, donde la línea continua es la respuesta ajustada al circuito equivalente mostrado en la Figura 49A.

El factor de rugosidad (r_f , por sus siglas en ingles que significan roughness factor) de los GCE utilizados en este proyecto, fue estimado mediante espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS, por sus siglas en ingles que significan electrochemical impedance spectroscopy) utilizando un potenciostato-galvanostato marca BAS-Zahner IM6 acoplado a una celda electroquímica de 3 electrodos donde un alambre de Pt fue usado como electrodo contador y los potenciales referenciados a un electrodo de Ag|AgCl (3M NaCl). La celda fue llenada con una solución acuosa de NaI 0.9N. El espectro EIS mostrado en la Figura 48, fue obtenido aplicando un potencial d.c. igual al potencial del sistema a circuito abierto y un potencial a.c. de ± 10 mV que fue barrido en una ventana de frecuencia de 100 kHz a 100 mHz. El circuito equivalente que se muestra en la Figura 49 fue cargado en el software ZviewTM v2.7 para ajustar el espectro.

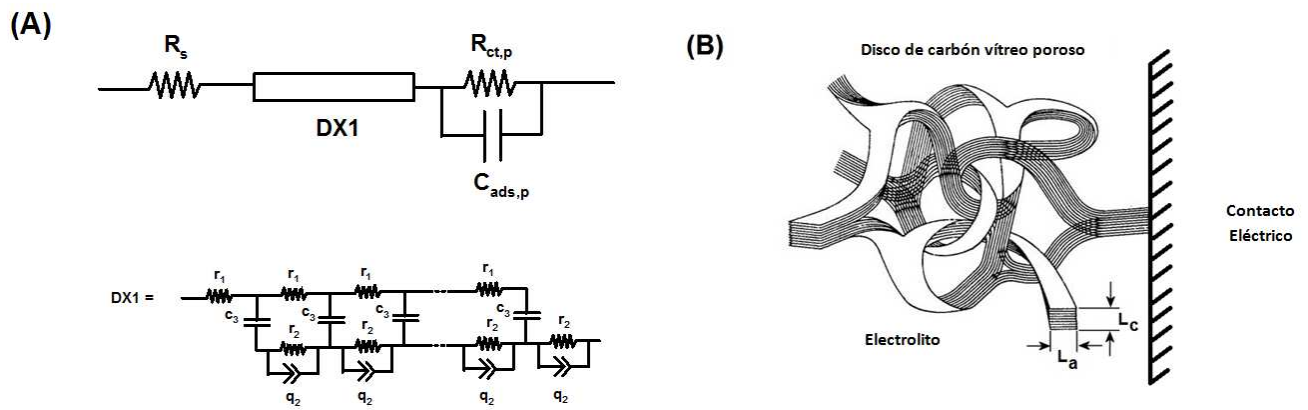


Figura 49. (A) Circuito equivalente ajustado al espectro experimental mostrado en la figura 48 basado en el esquema (B), que representa la estructura más aceptada del GCE poroso, donde el tamaño de cristalito para las microfibrillas orientadas aleatoriamente es solo $L_a(50\text{Å}) \times L_c(15\text{Å})$ [80] con un espacio intercapa de aproximadamente 3.5 Å , sugiriendo que los aniones F^- (Radio iónico de 1.5 Å [81]) pueden ser adsorbido en la región intercapa.

La Figura 49A muestra el circuito equivalente que incluye los siguientes elementos eléctricos: R_s es la resistencia de la disolución y DX1 (Bisquert #2) es un elemento usado para describir la impedancia en electrodos porosos [79]. En este elemento, las resistencia r_1 y r_2 son inversamente proporcionales a las conductividades para el transporte difusivo de iones a través de los poros (σ_ε) y a través de la espacio intercapa (σ_f) localizado en las microfibrillas del electrodo respectivamente (Figura 49B). Las capacitancias complementarias c_3 y los elementos de fase constante q_2 representan la carga iónica insertada en las respectivas fases. Finalmente, la resistencia a la transferencia de carga $R_{ct,p}$ y la capacitancia de adsorción $C_{ads,p}$ se agregan al modelo para ajustar el comportamiento de la carga iónica confinada en el fondo de los poros. Los elementos ajustados se presentan en la Tabla 10.

$R_s (\Omega)$	${}^a R_1 (\Omega)$	${}^b R_2 (k\Omega)$	${}^c C_2 (\mu F)$	$C_3 (mF)$	$R_{ct,p} (\Omega)$	$C_{ads,p} (\mu F)$
33.33 ± 0.16	197.3 ± 2.9	1.663 ± 0.019	1.54 ± 0.07	1.014 ± 0.006	47.62 ± 2.53	22.132 ± 0.002

Tabla 10. Componentes eléctricos del espectro EIS (Figura 48) ajustado al circuito equivalente mostrado en la Figura 49. Resistencia promedio obtenida del parámetro (a) r_1 , (b) r_2 , descrito por el elemento DX1, (c) capacitancia promedio obtenida del parámetro q_2 descrito por el elemento DX1.

El área electroactiva ($A_e=0.11 \text{ cm}^2$) fue calculada sustituyendo la capacitancia total interfacial (Ecuación 1) en la Ecuación 2, donde la capacitancia específica (C_{sp}) para el GCE inmerso en 0.9N de NaF a 25°C es $13 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ [82]. El factor de rugosidad estimado fue de 1.5. Este cálculo fue realizado empleando la Ecuación 3, donde A_g es el área geométrica para el GCE (0.071 cm^2). Este valor para el factor de rugosidad, concuerda con los reportados en la literatura [83].

$$\frac{1}{C_T} = \frac{1}{C_2} + \frac{1}{C_3} + \frac{1}{C_{ads,p}} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$A_{e,GCE} = \frac{C_T}{C_{sp}} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$r_f = \frac{A_{e,GCE}}{A_g} \quad \text{Ecuación 3}$$

Anexo 3. Artículo Publicado



Glassy carbon electrodes sequentially modified by cysteamine-capped gold nanoparticles and poly(amidoamine) dendrimers generation 4.5 for detecting uric acid in human serum without ascorbic acid interference



A.S. Ramírez-Segovia^{a,b}, J.A. Banda-Alemán^a, S. Gutiérrez-Granados^b, A. Rodríguez^a, F.J. Rodríguez^a, Luis A. Godínez^a, E. Bustos^a, J. Manríquez^{a,*}

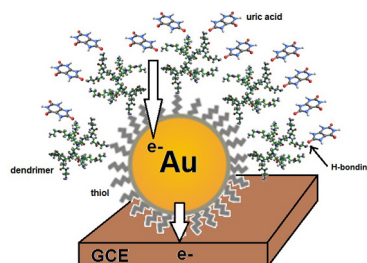
^a Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica S.C., Parque Tecnológico Querétaro s/n, Sanfandila, Pedro Escobedo 76703, Qro, Mexico

^b Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, Guanajuato 36050, Gto, Mexico

HIGHLIGHTS

- We constructed a modified electrode for detecting uric acid contained in human serum.
- Electrochemical detection of uric acid was comparable with the enzymatic method.
- Interference of ascorbic acid was not observed.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 September 2013

Received in revised form 8 December 2013

Accepted 18 December 2013

Available online 28 December 2013

Keywords:

Modified electrodes

Human serum

Uric acid

Gold nanoparticles

Dendrimers

ABSTRACT

Glassy carbon electrodes (GCE) were sequentially modified by cysteamine-capped gold nanoparticles (AuNp@cysteamine) and PAMAM dendrimers generation 4.5 bearing 128-COOH peripheral groups (GCE/AuNp@cysteamine/PAMAM), in order to explore their capabilities as electrochemical detectors of uric acid (UA) in human serum samples at pH 2. The results showed that concentrations of UA detected by cyclic voltammetry with GCE/AuNp@cysteamine/PAMAM were comparable (deviation $\leq \pm 10\%$; limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 1.7×10^{-4} and 5.8×10^{-4} mg dL⁻¹, respectively) to those concentrations obtained using the uricase-based enzymatic-colorimetric method. It was also observed that the presence of dendrimers in the GCE/AuNp@cysteamine/PAMAM system minimizes ascorbic acid (AA) interference during UA oxidation, thus improving the electrocatalytic activity of the gold nanoparticles.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

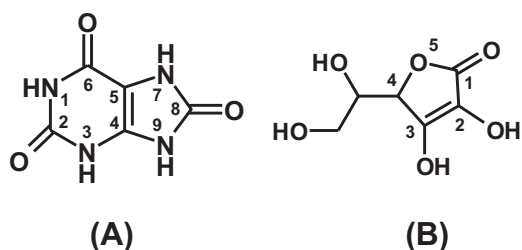
1. Introduction

Determination of uric acid (UA, Scheme 1A) in human serum acquired a new relevance in the last decade since several cases of

hyperuricemia have been associated with hypertension, obesity, diabetes, [1] and preeclampsia [2–4]. UA ($pK_{a1} = 5.4$, $pK_{a2} = 9.8$ [4]) has been oxidized in pH 4 aqueous medium at ~ 0.52 V vs. Ag|AgCl on glassy carbon electrodes (GCE) with slow electron transfer kinetics [5]. To overcome this limitation, GCE must be electro-activated in order to modify their surfaces with carboxyl groups [6,7], poly(vinyl alcohol) [8], poly(Evans blue) [5], OH- and COOH-terminated carbon nanotubes or graphitic oxide [9–13], among others functionalities. The primary result of these processes is that

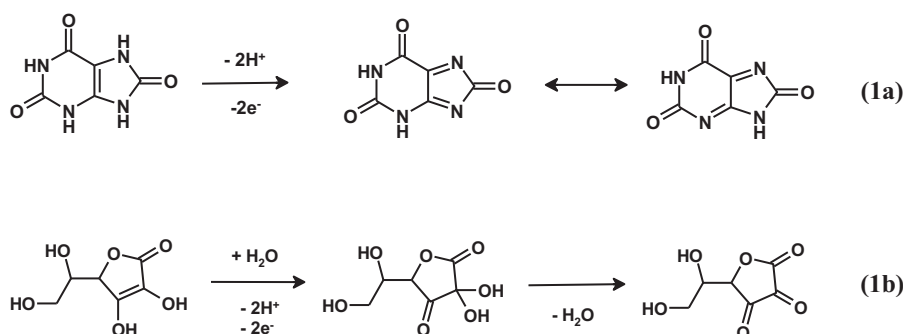
* Corresponding author. Tel.: +52 4422116061; fax: +52 4422116001.

E-mail addresses: jmanriquez@cideteq.mx, jmanriquezrocha@yahoo.com.mx (J. Manríquez).



Scheme 1.

the anodic currents associated with Reaction 1a [9] are promoted because UA molecules were preconcentrated on the glassy carbon surfaces.



The deposition of gold nanoparticles (AuNp) on properly pre-treated GCE to get UA preconcentration capabilities [13–15] resulted in electrocatalytic activity that significantly improved its sensitivity in determining UA in urine and/or human serum. Nevertheless, the electrochemical response of UA contained in human serum is typically interfered by simultaneous oxidation of ascorbic acid (AA, Scheme 1B) ($pK_a=4.10$ [16]) following Reaction 1b [17]. Therefore, differential pulse voltammetry (DPV) has traditionally been used to differentiate the electrochemical responses of UA and AA [5–8,10,13–15]. However, this situation creates an opportunity to determine whether working electrodes, modified by multifunctionalized materials (which have a soft but well-organized molecular architecture) would favor the preconcentration and oxidation of UA over AA.

Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers are unimolecular micelles that have been used for coating electrodes in order to endow the naked substrate with new physico-chemical properties [18]. Electrodes which have been modified in this way with dendritic materials have been employed to detect organohalogenated molecules [19], aggregate prussiates [20–22] and Ni(II)-tetraaza macrocycles [23], and promote the formation of supramolecular complexes based on β -cyclodextrin and ferrocenyl groups [24]. It was also reported that PAMAM dendrimers show remarkable capabilities to bind gold nanoparticles [25].

In this study, GCE were sequentially modified by cysteamine-capped gold nanoparticles (AuNp@cysteamine, Fig. 1a) and PAMAM dendrimers generation 4.5 bearing 128-COOH peripheral groups (Fig. 1b) in order to improve the electrochemical detection of UA in the presence of AA (as the main electroactive interference), both contained in random human serum samples diagnosed with hyper- or hypouricemia. According to published reports [26,27], COOH-terminated PAMAM dendrimers were chosen since carboxylic groups avoid non-specific adsorption of serum proteins on modified electrodes.

2. Experimental

2.1. Materials

Na_2HPO_4 anhydrous (99.1%), KH_2PO_4 (99.3%), H_2SO_4 (98.3%wt.), HCl (36.5–38%wt.), NaBH_4 (98%), and MeOH (HPLC grade) were purchased from J.T. Baker, while $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ (99.0%) and $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (99.9985%-Au) were obtained from Strem Chemicals. Cysteamine hydrochloride ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$, $\geq 98\%$), N -(3-dimethylaminopropyl)- N' -ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC, 98%), PAMAM dendrimer generation-4.5 (5%wt. in MeOH), L-ascorbic acid (99%), and uric acid ($\geq 99\%$) were acquired from Sigma-Aldrich. Random human serum samples were generously provided by the ISSSTE Clinical Hospital (Guanajuato, Gto, Mexico), where the content of UA was previously determined by means of an enzymatic colorimetric kit (Uric acid-LQ uricase-PODTM by

SPINREACT, Spain). All the solutions and dilutions were prepared with deionized water ($\rho \geq 18.18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) and previously bubbled with nitrogen (Praxair, 99.999%) for 10 min.

2.2. Apparatus

Cyclic voltammetry (CV) experiments were performed using an Epsilon BAS potentiostat connected to a 3-electrode cell, in which a glassy carbon disk (BASi, 3 mm-diameter) and a twisted platinum wire were used as the working- and counter-electrodes, respectively, while a RE-5B BASi Ag/AgCl (3 M NaCl) was employed as the reference electrode. The working electrodes were previously polished by means of a Buehler 698-3 Microcloth PSA impregnated with abrasive suspensions of $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ in deionized water (Buehler, particle diameters of 1.0, 0.3 and 0.05 μm). Finally, the as-prepared GCE were rinsed with water prior to use. CV responses were obtained in 0.5 M H_2SO_4 or phosphate buffer pH 2 (PBS-pH2) having an ionic strength of $I=0.1$.

Alternatively, electrochemical impedance spectroscopy (EIS) experiments were carried out by an IM6 BAS-Zahner potentiostat coupled to the same electrochemical cell, but now containing PBS-pH2 ($I=0.1$) + 1 mM $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$. EIS spectra were performed by applying a d.c. potential of 0.24 V (corresponding to $\text{E}^\theta[\text{Ru}^{3+}(\text{NH}_3)_6|\text{Ru}^{2+}(\text{NH}_3)_6]$) and an a.c. potential of $\pm 10 \text{ mV}$, which was scanned in a frequency window of 100 kHz to 100 mHz. A modified Randles equivalent circuit (Fig. 2) was loaded into the SIMTM Zahner software to be fitted to the experimental spectra [28,29]. All the CV and EIS experiments were carried out at 25 °C.

2.3. Procedures

2.3.1. Preparation of cysteamine-capped gold nanoparticles (AuNp@cysteamine)

AuNp@cysteamine were obtained by modifying reported methodologies [30,31]. A 0.5 M cysteamine solution (60 μL) was

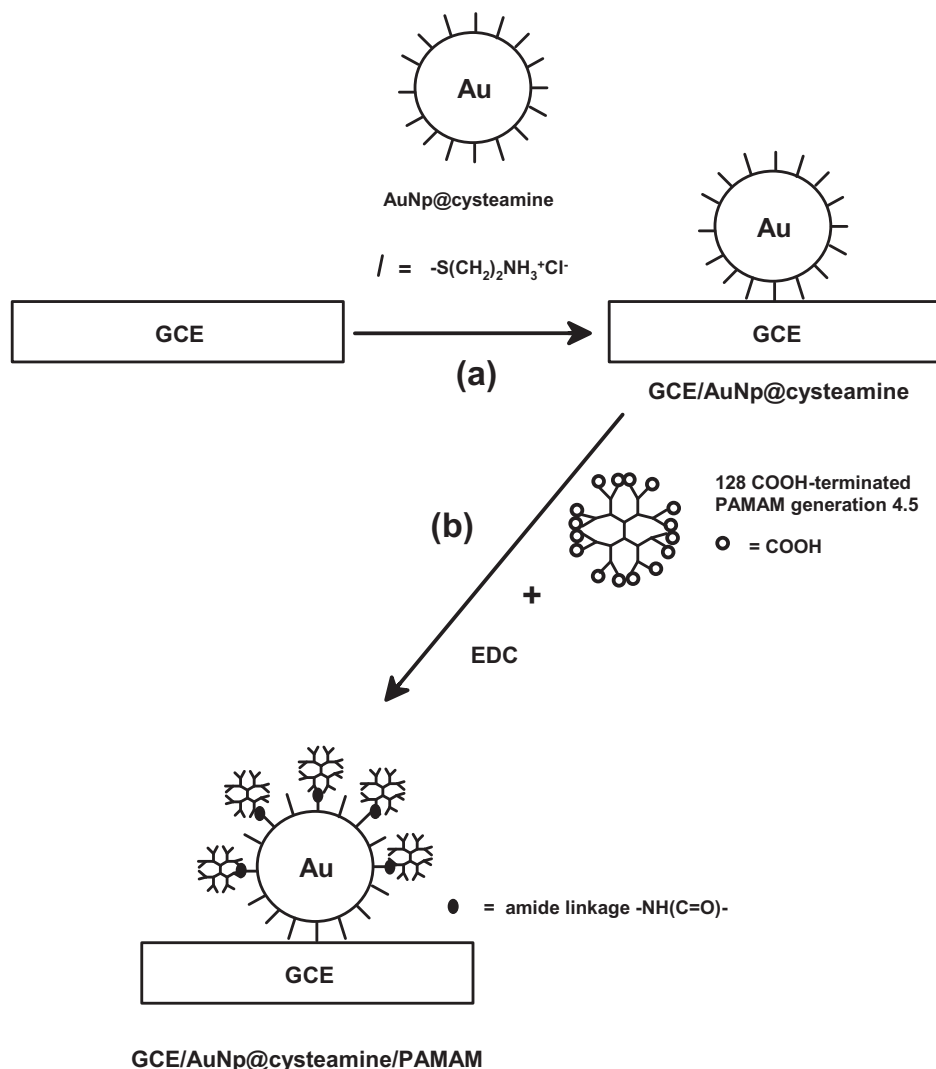


Fig. 1. Sequential modification of GCE, where step (a) represents the electroadsorption of AuNp@cysteamine on naked GCE and step (b) corresponds to the chemisorption of PAMAM dendrimers generation 4.5 on GCE/AuNp@cysteamine.

initially added to 1 mM HAuCl_4 (15 mL) while stirring, and immediately afterwards a 8 mM NaBH_4 solution (5 mL, previously frozen at 4°C) was slowly added dropwise. An absorption maximum observed at 525 nm in the UV–vis spectrum (see Supporting Data S1 for details) demonstrated the formation of gold nanoparticles with diameters $D_{\text{AuNp}} \cong 11$ nm [30]. Afterwards this mixture was stored in an amber flask for 24 h before being used.

2.3.2. Electroadsorption of AuNp@cysteamine on GCE (GCE/AuNp@cysteamine)

To confine thiol-capped gold nanoparticles on the working electrodes (Fig. 1, step (a)), GCE were immersed in a fresh AuNp@cysteamine solution (15 mL) contained in an electrochemical cell in order to apply 0.1 V vs. Ag|AgCl (3 M NaCl) for 40 s. As illustrated in Fig. 3 [32,33], $-\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_3^+$ groups covering only one hemisphere from AuNp@cysteamine were expected to electrogenerate covalent bonds with GCE surfaces. A signal observed at 260 cm^{-1} in the Raman spectrum (see Supporting Data S2 for details) demonstrated the electroadsorption of AuNp@cysteamine on GCE. Finally the as-modified electrodes were rinsed with water prior to use.

2.3.3. Chemical adsorption of PAMAM dendrimers on GCE/AuNp@cysteamine

The newly deposited AuNp@cysteamine layers on GCE were immersed for 48 h in MeOH containing 10 mM EDC + $18\ \mu\text{M}$ PAMAM dendrimers generation 4.5 following a previously reported methodology [22]. It was expected (Fig. 1, step (b)) that EDC would promote the formation of amide $\text{NH}(\text{C}=\text{O})$ linkages between $-\text{COOH}$ terminals occupying only one dendritic hemisphere and the remaining $-\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_3^+$ terminals covering

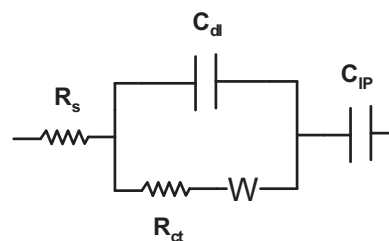


Fig. 2. Equivalent circuit fitted to the EIS spectra experimentally obtained by following the modification steps described in Fig. 1. A description for the electrical elements is detailed in Table 1.

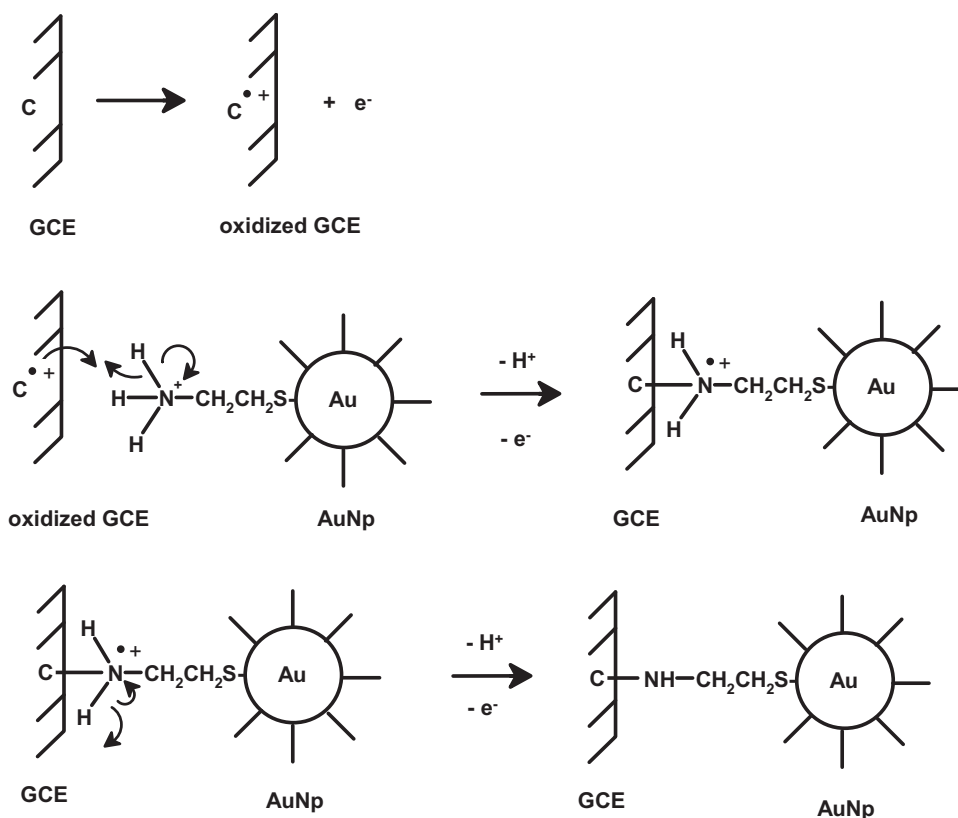


Fig. 3. Electrochemical mechanism proposed to explain the electroadsorption of AuNP@cysteamine on GCE. Most of the cysteamine molecules covering the AuNP were represented by lines for simplicity.

AuNP@cysteamine, those which did not react with GCE during the step (b) in Fig. 1. The FT-IR spectra obtained for the GCE/AuNP@cysteamine/PAMAM system showed a vibrational peak at 1740 cm^{-1} (which was attributed to the C=O stretching mode for the COOH groups localized at the outer rim of the PAMAM dendrimers) demonstrated that the GCE/AuNP@cysteamine system was coated by these unimolecular micelles (see Supporting Data S3 for details).

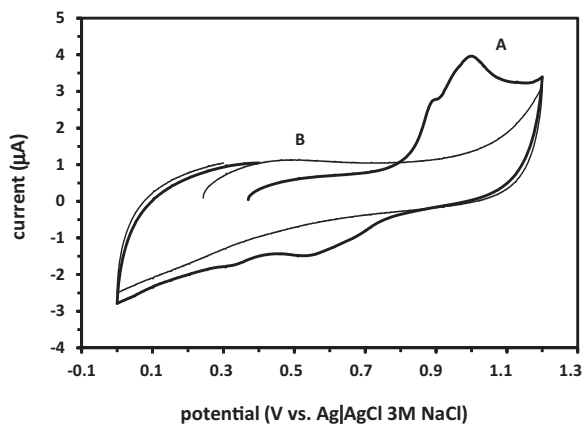


Fig. 4. CV responses obtained for (A) AuNP@cysteamine-modified GCE and (B) naked GCE in $0.5\text{ M H}_2\text{SO}_4$ at 40 mV s^{-1} . Experiments were carried out at $25\text{ }^\circ\text{C}$.

3. Results and discussion

3.1. Modification of GCE with AuNP@cysteamine

Fig. 4A shows the CV response obtained for AuNP@cysteamine-modified GCE immersed in aqueous $0.5\text{ M H}_2\text{SO}_4$. This figure shows broad anodic peaks between 0.8 and 1.2 V , which were associated to the electro-formation of AuO through the consecutive Reactions (2) and (3). Similarly, broad cathodic peaks were observed between 0.7 and 0.4 V due to the reverse sense of the same reactions [34].

Since the charge (Q_{AuO}) required to grow a AuO monolayer on polycrystalline gold was reported to be $200\text{ }\mu\text{C cm}^{-2}$ [34], the faradic charge integrated from anodic peaks (Q_a) in Fig. 4A provided an estimated electroactive area ($A_{e,\text{AuNP}} = Q_a \cdot Q_{\text{AuO}}^{-1}$) of 0.055 cm^2 for all the confined AuNP on the GCE. Therefore, $A_{e,\text{AuNP}}$ was converted into particle density of $\Gamma_{\text{AuNP}} = 1358\text{ AuNP }\mu\text{m}^{-2}$ by entering the geometric area $A_g = 0.071\text{ cm}^2$ and the roughness factor $r_f = 1.5$ for GCE (see Supporting Data S4 for details) into Relationship (4), thus predicting that only 13% (i.e. $\Gamma_{\text{AuNP}} \cdot \Gamma_{m,\text{AuNP}}^{-1}$) of the electrode surface was coated by AuNP, since a particle density of $\Gamma_{m,\text{AuNP}} = 10522\text{ AuNP }\mu\text{m}^{-2}$ (Relationship (5)) is theoretically needed to produce a AuNP monolayer.



$$\Gamma_{\text{AuNP}} = \frac{10^6 A_{e,\text{AuNP}}}{r_f A_g \pi D_{\text{AuNP}}^2} \quad (D_{\text{AuNP}} \text{ in nm}) \quad (4)$$

$$\Gamma_{m, \text{AuNp}} = \frac{4 \times 10^6}{\pi D_{\text{AuNp}}^2} (D_{\text{AuNp}} \text{ in nm}) \quad (5)$$

To better study the architecture of the as-confined AuNp@cysteamine on GCE, charge transfer resistances for naked GCE (R_{ct}^0) and GCE/AuNp@cysteamine (R_{ct}^I) were fitted (Table 1) from the EIS spectra shown in Fig. 5A and B, respectively. Thereafter, both resistances were fed into Relationship (6) [35,36], thus indicating that only 11% (i.e. θ_I) of the GCE surface was occupied by AuNp@cysteamine. This interesting result was comparable to the value previously estimated from VC data ($\Gamma_{\text{AuNp}} \cdot \Gamma_{m, \text{AuNp}}^{-1} = 0.13$), thus revealing that the thickness of the cysteamine shell ($R_{\text{cys}} \cong 1.5 \text{ nm}$ [18]) represents only 12% of the effective AuNp@cysteamine radius ($R_{\text{eff}} = R_{\text{AuNp}} + R_{\text{cys}}$).

$$\theta_I = \frac{R_{ct}^I - R_{ct}^0}{R_{ct}^I} \quad (6)$$

3.2. Adsorption of PAMAM dendrimers on GCE/AuNp@cysteamine

Fig. 5C shows the EIS spectrum for GCE/AuNp@cysteamine chemically coated with PAMAM dendrimers generation 4.5 (6.6 nm-diameter [37] bearing COOH terminals with a $\text{p}K_a \cong 2.14$, which was estimated from data reported in the same reference (see Supporting Data S5 for details). The charge transfer resistance related to the confinement of these micelles (R_{ct}^{II}) was fitted (Table 1) and later fed into Relationship (7) [38], thus revealing that only 70% (i.e. θ_{II}) of the previously adsorbed AuNp@cysteamine was topped with PAMAM molecules (Fig. 1 step (b)).

$$\theta_{II} = 1 - \frac{R_{ct}^{II}}{R_{ct}^I} \quad (7)$$

3.3. UA oxidation on GCE/AuNp@cysteamine

AuNp@cysteamine/PAMAM-modified GCE were used to obtain CV responses for known UA concentrations, which were prepared by diluting with a UA 100 μM stock solution in an electrochemical cell containing 5 mL of PBS-pH2 $I=0.1$ (all UA concentrations were reported in mg dL^{-1} by using the conversion factor $\mu\text{mol L}^{-1} = 59.5 \times (\text{mg dL}^{-1})$). Fig. 6A shows oxidation peaks at 0.58 V, in good agreement with the literature [5]. A more detailed inspection of this figure reveals that anodic currents obtained from peaks at 0.58 V were proportional to UA concentrations (calibration line parameters: slope = 1364.9 nA mg^{-1} dL, y-axis intercept = 10.8 nA, and correlation $r^2 = 0.9977$). On the contrary, Fig. 6B shows that the electrochemical response for UA was absent on the naked GCE, thus demonstrating that UA oxidation was promoted by coating GCE with AuNP@cysteamine/PAMAM films. A plausible explanation for this phenomenon could be formulated by invoking two simultaneous physico-chemical contributions at pH 2: (a) no-covalent interactions between dendrimers and UA [12,39] and (b) electrocatalytic UA oxidation promoted by AuNP [13–15].

In the context of contribution (a), the interactions between UA and dendrimers could be favorable by assuming that COOH groups ($\text{p}K_a \cong 2.14$ [37]) at the outer rim of the dendrimers are 42% deprotonated as carboxylate terminals (see Supplementary Data S5), while the tertiary amines moieties in the dendrimers core are already protonated ($-\text{NH}^+<$) because their $\text{p}K_a$ values are about 6.7 and 7.5 for “the innermost” and “all other” tertiary amines, respectively [40]. Therefore, this reasoning strongly suggests that C=O groups localized in positions 8 and 2 (Scheme 1A) from UA ($\text{p}K_{a1} = 5.4$, $\text{p}K_{a2} = 9.8$

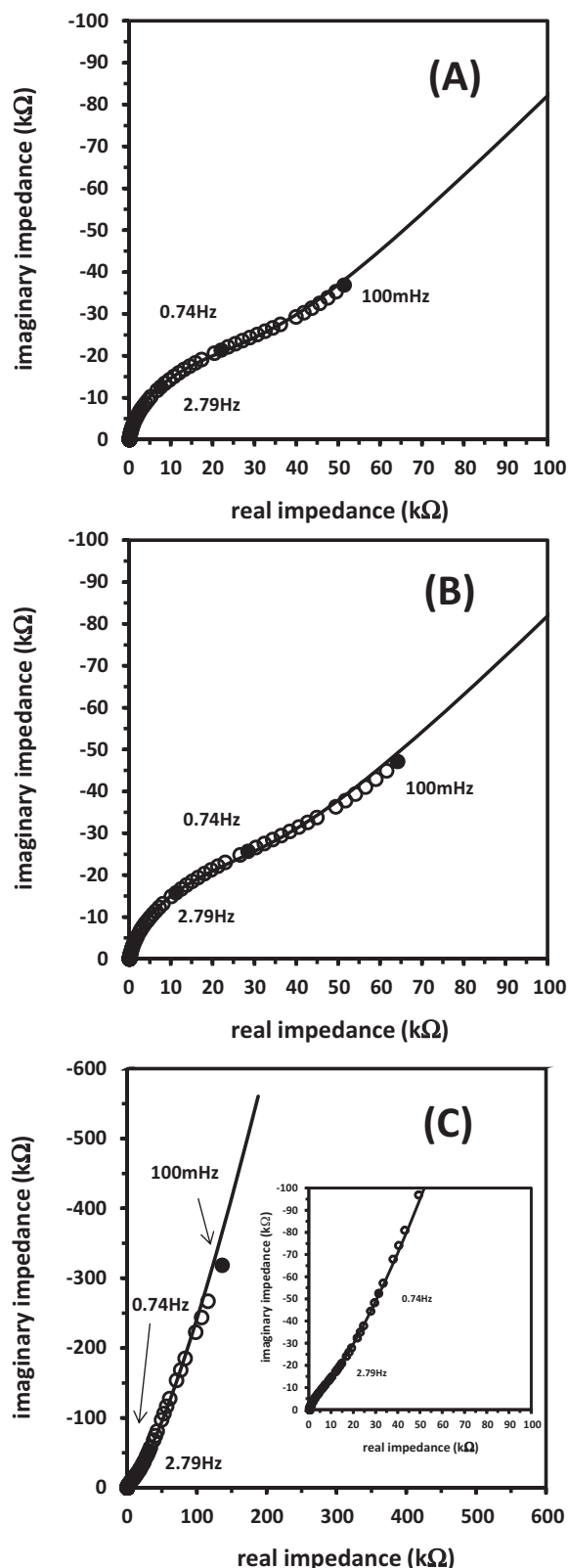


Fig. 5. EIS spectra obtained for the systems (A) naked GCE, (B) GCE/AuNp@cysteamine and (C) GCE/AuNp@cysteamine/PAMAM in PBS-pH2 ($I=0.1$) + 1 mM $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$. All the experiments were performed at 25 °C. Inset: a close up from spectrum shown in (C).

Table 1

Compilation of fitted electrical elements from the experimental EIS spectra shown in Fig. 5 by utilizing the equivalent circuit introduced in Fig. 2.

System	^a R _s (Ω)	^b R _{ct} (kΩ)	^c W (kΩ s ^{-1/2})	^d C _{dl} (μF)	^e C _{IP} (μF)
(0) GCE	136.2 ± 6.0	28.75 ± 1.29	40.18 ± 3.24	2.23 ± 0.05	^f N.O.
(I) GCE/AuNp@cysteamine	160.5 ± 5.3	32.22 ± 1.48	53.33 ± 4.09	2.16 ± 0.06	^f N.O.
(II) GCE/AuNp@cysteamine/PAMAM	405.7 ± 19.1	9.61 ± 0.46	47.6 ± 1.91	2.61 ± 0.01	14.59 ± 0.90

^a Ohmic drop established between reference electrode and naked- or modified GCE.^b Charge transfer resistance for Ru(NH₃)₆³⁺/Ru(NH₃)₆²⁺ redox couple on naked- or modified GCE.^c Semi-infinite diffusion of Ru(NH₃)₆³⁺ cations.^d Accumulated charge at the electrolyte–glassy carbon interfaces.^e Accumulated charge at this interface could be caused by formation of ionic pairs (IP) between Ru(NH₃)₆³⁺ cations and carboxylated (COO⁻) terminals outer rim of PAMAM dendrimers (this is reasonable since at pH 2, 42% from COOH terminals have been deprotonated; see Supporting Data S5 for details).^f N.O. stands for response “Not Observed” at the EIS spectrum.

[4], respectively) could establish intermolecular hydrogen bonding (C=O···H) with the COOH groups at the outer rim of the dendrimers, thus promoting interfacial UA preconcentration [12,39].

Conversely, contribution (b) could be supported by comparing CV responses for UA oxidation on naked GCE (Fig. 6B) and gold particle-modified GCE (i.e. GCE/AuP, Fig. 6C). GCE/AuP were prepared by following an electrodeposition setup, which is detailed in Supplementary Data S6. A comparison between Fig. 6C and B reveals that UA oxidation occurs on GCE/AuP at around 0.75 V, while the same process was absent on naked GCE, respectively. This result clearly demonstrates that AuNp are responsible for endowing electrocatalytic activity to GCE/AuNp@cysteamine/PAMAM system.

To better understand how interfacial preconcentration (provided by PAMAM dendrimers) and electrocatalytic activity (provided by AuNp) contribute to the UA oxidation current GCE/AuNp@cysteamine/PAMAM system, Fig. 7 shows a comparison between UA oxidation currents obtained on GCE/AuNp@cysteamine/PAMAM and GCE/AuP, both in PBS-pH2 (I=0.1). It is important to note that oxidation currents were previously normalized to the surface densities for the confined gold (i.e. Γ_{Au}) on GCE/AuNp@cysteamine/PAMAM (12.2 nmol Au cm⁻²) and GCE/AuP (9.2 nmol Au cm⁻²) systems. See Supplementary Data S7 for details about the estimation of these parameters.

A thorough inspection of Fig. 7 reveals that interfacial preconcentration of UA is clearly significant when UA concentrations are small (0.03–0.12 mg dL⁻¹), demonstrating that dendritic micelles promote the gathering of UA in the proximity of metallic electrocatalytic sites when their electrochemical potential is low. On the other hand, when UA concentration is higher (0.12–0.25 mg dL⁻¹), preconcentration phenomenon is not needed anymore, indicating that UA molecules have acquired enough electrochemical potential to reach the metallic electrocatalytic sites by themselves.

Table 2

Comparison between UA determinations for random human serum samples by means of uricase-based enzymatic-colorimetric method and cyclic voltammetry technique.

Patient	Gender	Age (years)	^a U _A C (mg dL ⁻¹)	^b I _{CV} (nA)	^c U _A CV (mg dL ⁻¹)	^d Deviation (%)
1	Male	97	10.6	324.0	11.5	+8.49
2	Male	42	8.4	252.0	8.8	+4.76
3	Male	Unknown	3.7	112.5	3.7	0
4	Female	43	4.3	130.5	4.4	+2.32
5	Female	9	5.0	153.0	5.2	+4.00
6	Female	4	2.4	74.2	2.3	-4.17

^a Determinated by uricase-based enzymatic-colorimetric method. Reference values in serum or plasma [40,41]; men 3.6–7.7 mg dL⁻¹ ≅ 214–458 μM; women 2.5–6.8 mg dL⁻¹ ≅ 149–405 μM.^b Obtained from Fig. 8A.^c Calculated from Relationship (8). Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were obtained from Fig. 6A to be 1.7 × 10⁻⁴ and 5.8 × 10⁻⁴ mg dL⁻¹, respectively, utilizing the equations LOD = 3σ_b × (1364.9 nA mg⁻¹ dL⁻¹)⁻¹ and LOQ = 10σ_b × (1364.9 nA mg⁻¹ dL⁻¹)⁻¹, where σ_b (in nA) is the standard deviation of the background current [42].^d Estimated by duplicated as deviation (%) = [(U_ACV - U_AC) / U_AC] × 100.

3.4. UA oxidation on GCE/AuNp@cysteamine/PAMAM

To analyze the electrochemical response of UA contained in human serum (Table 2), real samples were 50-times diluted without pretreatment in order to use the calibration line parameters reported in Section 3.3 in an electrochemical cell containing 5 mL of PBS-pH2 (I=0.1). Subsequently, the total UA concentration in the samples (C_{UA,sample} in mg dL⁻¹) was computed by feeding the anodic currents (I_{CV}, in nA) observed in Fig. 8A at 0.60 V into Relationship (8), in which simultaneous oxidation of AA contained in the human serum was clearly absent.

$$C_{UA,sample} = \left(\frac{I_{CV} - 10.869}{1364.9} \right) \times 50 \quad (8)$$

A comprehensive inspection of Table 2 reveals that UA determinations in human serum by means of GCE/AuNp@cysteamine/PAMAM showed a performance comparable to the enzymatic colorimetric method, since the associated deviations of the electrochemical methodology were smaller than ±10% for all the samples.

3.5. Hydrogen bonding and minimization of AA interference during UA detection in human serum at pH 2

A review of Scheme 1B suggests that AA could be preconcentrated in the GCE/AuNp@cysteamine/PAMAM system, since the >C=O group, at position 1 from AA molecules, might also establish hydrogen bonds with COOH terminals at the outer rim of confined dendrimers on GCE [39]. Nevertheless, Fig. 8A demonstrates that the AA oxidation signal at pH 2 is not significant when AuNp@cysteamine/PAMAM-modified GCE are used for testing human serum samples. A similar effect is reported for the simultaneous detection of UA and AA contained in urine samples by means of glutamic acid-modified GCE [43].

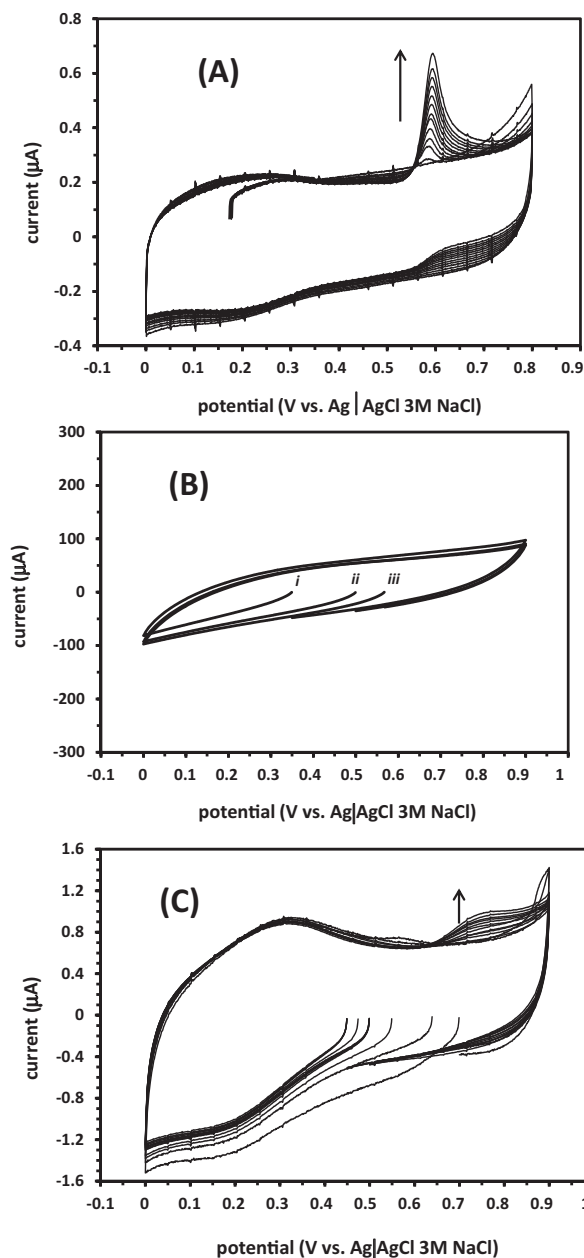


Fig. 6. (A) CV responses obtained for UA oxidation at 0.58 V on GCE/AuNp@cysteamine/PAMAM in PBS-pH2 ($I=0.1$). UA concentrations were successively increased (see arrow inset) as follows: 0, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, 0.20, 0.22 and 0.25 mg dL⁻¹. (B) CV responses obtained for a GCE in PBS-pH2 ($I=0.1$)+UA at (i) 0, (ii) 0.03 and (iii) 0.25 mg dL⁻¹. (C) CV responses obtained for UA oxidation at 0.75 V on GCE/AuP in PBS-pH2 ($I=0.1$). UA concentrations were successively increased (see arrow inset) as follows: 0, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, 0.20, 0.22 and 0.25 mg dL⁻¹. All the CV experiments were carried out at 40 mV s⁻¹ and 25 °C.

A plausible explanation for this tendency could be described by assuming the existence of keto-enol tautomers at UA [44] and AA [45] molecules, suggesting that intermolecular hydrogen bonding between >C=O (at UA and AA) and COOH groups (at dendrimers) would be thermodynamically more favorable for those molecules having the largest number of tautomers. Accordingly, the number of hydrogen bonding possibilities should be higher for UA than for AA, since UA shows up to 22 stable tautomers per molecule [44] and AA shows only 3 stable tautomers per molecule [45]. Therefore, this reasoning agrees with the results found in Fig. 8B, in which AA interferences are observed during the electrochemical determination of

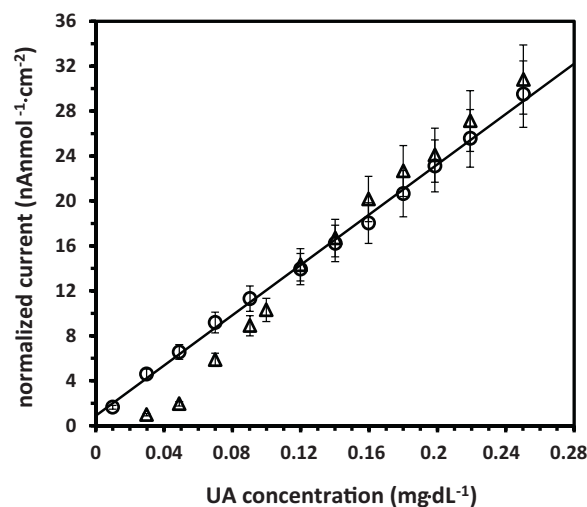


Fig. 7. Comparison between UA oxidation currents obtained on GCE/AuNp@cysteamine/PAMAM (O) and GCE/AuP (Δ) immersed in PBS-pH2 ($I=0.1$). Oxidation currents (in nA) were taken from Fig. 6A (at 0.60 V) and Fig. 6C (at 0.75 V), respectively, and later normalized to the respective gold density (Γ_{Au} , in nmol cm⁻²). Continues line corresponds to the tendency followed by the calibration line parameters reported in Section 3.3.

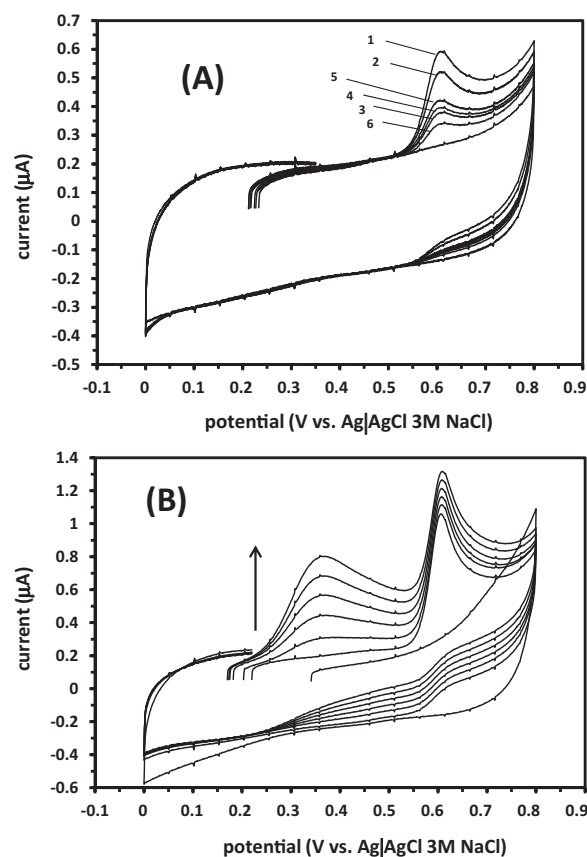


Fig. 8. (A) Overlay for all the CV responses obtained for UA contained in human serum samples (see Table 2) by utilizing AuNp@cysteamine/PAMAM-modified GCE in PBS-pH2 ($I=0.1$). UA oxidation peaks were observed at 0.6 V. Numbers inset stand for the numbers assigned to the patients enlisted in this table. CV response without signal at 0.60 V corresponds to the absence of added sample into the electrolytic medium. (B) CV responses obtained for AA oxidation on GCE/AuNp@cysteamine/PAMAM in PBS-pH2 ($I=0.1$)+0.42 mg dL⁻¹ UA. AA oxidation peaks were observed at 0.35 V. Excesses of AA were successively added (see arrow inset) as follows: 0, 0.09, 0.17, 0.26, 0.35 and 0.44 mg dL⁻¹ (reference range in human serum is 0.4–1.5 mg dL⁻¹ [46]). CV response without signals at 0.60 and 0.35 V corresponds to the absence of UA and AA in the electrolytic medium.

UA, only when AA is intentionally added to the electrochemical cell to get very high concentrations.

4. Conclusions

Electrochemical detection of UA was successfully carried out in human serum samples using GCE that were sequentially modified by gold nanoparticles and dendritic micelles to appropriately combine their electrocatalytic and preconcentration properties, respectively. Electrocatalytic oxidation of UA carried out by gold nanoparticles were found to be enhanced at diluted UA concentrations by interfacial preconcentration of UA promoted by the presence of dendritic materials. Electroanalysis of human serum samples indicated that interfacial preconcentration phenomenon is caused by intermolecular hydrogen bonding between COOH groups at the outer rim of dendrimers and $>C=O$ groups at UA or AA. However, these experimental results indicate that preconcentration activity through $>C=O \cdots H$ linkages is thermodynamically more favorable for UA than for AA, since the former has a larger number of keto-enol tautomers than the latter, thus increasing the number of intermolecular hydrogen bonding possibilities at the modified electrode interface.

Finally, it is important to point out that the strategy of modification here shown introduces a novel way for preparing chemically modified electrodes, which could be useful for overcoming the troubles of interference associated to the electrochemical detection of metabolites having importance into the clinical diagnosis of human diseases.

Acknowledgments

The authors would like to thank CONACyT and FOMIX QUERETARO-CONACYT for financial support (Grants 106000 and QRO-2010-C01-145394, respectively). A.S.R.S. thanks CIDETEQ for the support of the Undergraduate Scholarship Program. J.A.B.A. thanks CONACyT for the support of the Postgraduate Scholarship Program. The authors also thank César A. Alvarez-Casillas (Research Program of CIDETEQ for Undergraduates) for all the technical support offered to help carry out electrodeposition of gold on glassy carbon electrodes.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2013.12.025>.

References

- [1] M. Heining, R.J. Johnson, *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 12 (2006) 1059–1064.
- [2] S.A. Bainbridge, J.M. Roberts, *Placenta* 22 (2008) S67–S72.
- [3] R.J. Johnson, M. Kanbay, D.-H. Kang, L.G. Sánchez-Lozada, D. Feing, *Hypertension* 58 (2011) 548–549.
- [4] B.L. Goodall, A.M. Robinson, C.L. Brosseau, *Physical Chemistry Chemical Physics* 15 (2013) 1382–1388.
- [5] L. Lin, J. Chen, H. Yao, Y. Chen, Y. Zheng, X. Lin, *Bioelectrochemistry* 73 (2008) 11–17.
- [6] J.X. Qiao, H.Q. Luo, N.B. Li, *Colloids and Surfaces B* 62 (2008) 31–35.
- [7] Z. Temoçin, *Sensors and Actuators B* 176 (2013) 796–802.
- [8] Y. Li, X. Lin, *Sensors and Actuators B* 115 (2006) 134–139.
- [9] X.-J. Huang, H.-S. Im, O. Yarimaga, J.-H. Kim, D.-H. Lee, H.-S. Kim, Y. Kyu Choi, *Journal of Physical Chemistry B* 110 (2006) 21850–21856.
- [10] H. Bi, Y. Li, S. Li, P. Guo, Z. Wei, C. Lv, J. Zhang, X.S. Zhao, *Sensors and Actuators B* 171–172 (2012) 1132–1140.
- [11] H. Zare, N. Nasirizadeh, *Sensors and Actuators B* 143 (2010) 666–672.
- [12] J.-L. Chang, K.-H. Chang, C.-C. Hu, W.-L. Cheng, J.-M. Zen, *Electrochemistry Communications* 12 (2010) 596–599.
- [13] S. Liu, J. Yan, G. He, D. Zhong, J. Chen, L. Shi, X. Zhou, H.J. Jiang, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 672 (2012) 40–44.
- [14] G. Hu, Y. Ma, Y. Guo, S. Shao, *Electrochimica Acta* 53 (2008) 6610–6615.
- [15] J. Li, X.-Q. Lin, *Analytica Chimica Acta* 596 (2007) 222–230.
- [16] G.V. Perez, A.L. Perez, *Journal of Chemical Education* 77 (2000) 910–915.
- [17] Q. Wang, A. Geiger, R. Frias, T.D. Golden, *Chemical Educator* 5 (2000) 58–60.
- [18] J. Manríquez, E. Juaristi, O. Muñoz-Muñiz, L.A. Godínez, *Langmuir* 19 (2003) 7315–7323.
- [19] J. Ledesma-García, J. Manríquez, S. Gutiérrez-Granados, L.A. Godínez, *Electroanalysis* 15 (2003) 659–666.
- [20] J.A. López, J. Manríquez, S. Mendoza, L.A. Godínez, *Electrochemistry Communications* 9 (2007) 2133–2139.
- [21] E. Bustos, J. Manríquez, G. Orozco, L.A. Godínez, *Langmuir* 21 (2005) 3013–3021.
- [22] U. López-García, C. Frontana, J. Manríquez, L.A. Godínez, *Electrochemical and Solid-State Letters* 13 (2010) P7–P10.
- [23] M.A. González-Fuentes, J. Manríquez, S. Gutiérrez-Granados, A. Alatorre-Ordaz, L.A. Godínez, *Chemical Communications* (2005) 898–900.
- [24] E. Bustos, J. Manríquez, E. Juaristi, T.W. Chapman, L.A. Godínez, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 19 (2008) 1010–1016.
- [25] T. Mandal, C. Dasgupta, P.K. Maiti, *Journal of Physical Chemistry C* 117 (2013) 13627–13636.
- [26] M.C.L. Martins, C. Fonseca, M.A. Barbosa, B.D. Ratner, *Biomaterials* 24 (2003) 3697–3706.
- [27] S. Choi, J. Chae, *Journal of Micromechanics and Microengineering* 20 (2010) 07015, 9 pp.
- [28] S.E. Creager, T.T. Wooster, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 4257–4263.
- [29] A.L. Eckermann, D.J. Feld, J.A. Shaw, T.J. Meade, *Coordination Chemistry Reviews* 254 (2010) 1769–1802.
- [30] B. Pan, F. Gao, L. Ao, H. Tian, R. He, D. Cui, *Colloids and Surfaces A* 259 (2005) 89–94.
- [31] R. Aroca, *Surface-enhanced Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons, West Sussex, 2006.
- [32] E. Lojou, P. Bianco, *Bioelectrochemistry* 69 (2006) 237–247.
- [33] R.S. Deinhhammer, M. Ho, J.W. Anderegg, M.D. Porter, *Langmuir* 10 (1994) 1306–1313.
- [34] H. Angerstein-Kozłowska, B.E. Conway, A. Hamelin, L. Stoicovicu, *Electrochimica Acta* 31 (1986) 1051–1061.
- [35] H. Tokuhisa, M. Zhao, L.A. Baker, V.T. Phan, D.L. Dermody, M.E. García, R.F. Peez, R.M. Crooks, T.M. Mayer, *Journal of the American Chemical Society* 120 (1998) 4492–4501.
- [36] E. Bustos Bustos, M.G. García Jiménez, B.R. Díaz-Sánchez, E. Juaristi, T.W. Chapman, L.A. Godínez, *Talanta* 72 (2007) 1586–1592.
- [37] S. Jockusch, N.J. Turro, D.A. Tomalia, *Macromolecules* 28 (1995) 7416–7418.
- [38] O.A. Arotiba, J.H. Owino, P.G. Baker, E.I. Iwuoha, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 638 (2010) 287–292.
- [39] P. Kalimuthu, D. Suresh, S. Abraham John, *Analytical Biochemistry* 357 (2006) 188–193.
- [40] D. Cakara, J. Kleinmann, M. Borkovec, *Macromolecules* 36 (2003) 4201–4207.
- [41] A. Schultz, Uric acid, in: A. Kaplan, et al. (Eds.), *Clin. Chem., The C.V. Mosby Co., St. Louis/Toronto/Princeton*, 1984, pp. 1261–1266, 1418.
- [42] J. Mocak, A.M. Bond, S. Mitchell, G. Scollary, *Pure and Applied Chemistry* 69 (1997) 297–328.
- [43] L. Zhang, X. Lin, *Analyst* 126 (2001) 367–370.
- [44] E.D. Raczynska, M. Makowski, M. Szelag, B. Kamińska, K. Zientara, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 947 (2010) 83–91.
- [45] H. Liu, B. Xiang, L. Qu, *Journal of Molecular Structure* 794 (2006) 12–17.
- [46] *AMA Manual of Style: A Guide for Authors and Editors*, 10th ed., Oxford University Press, New York, 2007, pp. 814.

Glassy carbon electrodes sequentially modified by cysteamine-capped gold nanoparticles and poly(amidoamine) dendrimers generation 4.5 for detecting uric acid in human serum without ascorbic acid interference.

A.S. Ramírez-Segovia,^{1,2} J.A. Banda-Alemán,¹ S. Gutiérrez-Granados,² A. Rodríguez,¹ F.J. Rodríguez,¹ Luis A. Godínez,¹ E. Bustos,¹ J. Manríquez^{1*}

¹ Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica S.C., Parque Tecnológico Querétaro s/n, Sanfandila, Pedro Escobedo, 76703, Qro., México.

² Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato. Noria Alta s/n, Guanajuato, 36050, Gto., México.

*E-mail: jmanriquez@cideteq.mx

Supplementary data

S1. UV-Vis spectroscopy for AuNp@cysteamine

UV-Vis absorption spectrum for cysteamine-capped AuNp (Fig.1) was performed using an Ocean Optics USB2000+F0009 UV-Vis spectrophotometer, after which the synthesis mixture was stored in darkness for 1.5h without stirring. Then the UV-Vis spectrum for the rested mixture was obtained by diluting in rectangular quartz cuvette (optical path 1cm-length) containing deionized water (3mL). Signal observed at 525nm corresponds to the plasmonic absorption for the as-prepared AuNp [1,2].

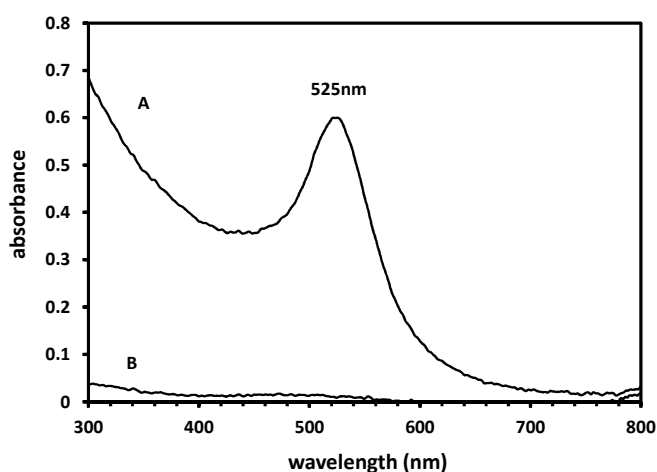


Fig.1 UV-Vis absorption spectrum obtained for deionized water in the presence (A) and in the absence (B) of AuNp@cysteamine at 25°C.

S2. Raman spectroscopy of glassy carbon electrodes coated by AuNp@cysteamine

Raman spectra for naked (Fig.2-*i*) and AuNp@cysteamine-modified (Fig.2-*ii*) glassy carbon electrodes (GCE) were performed by means of a DXR Thermo-Scientific Raman Microscope (10X-objective, 50 μ m-slit) equipped with a 14mW laser emitting at 780 \pm 0.2nm. A comparison between these spectra reveals a metal-sulfur (M-S) vibrational peak localized at 256cm⁻¹ for the spectrum of the GCE/AuNp@cysteamine system (Fig.2-*ii*), which was attributed to the AuNp-S stretching mode [3,4]. Since this signal was absent in the obtained spectrum for the naked GCE (Fig.2-*i*), this observation demonstrated the presence of AuNp@cysteamine on the GCE surface.

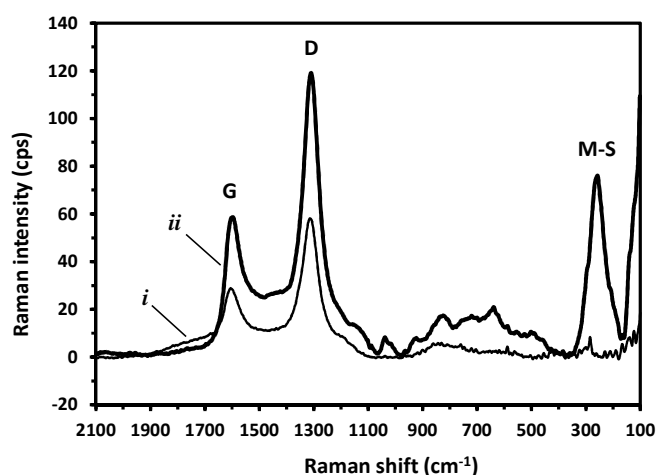


Fig.2 Micro-Raman spectra obtained for naked (*i*) and AuNp@cysteamine-modified (*ii*) GCE at 25°C. While the vibrational bands denoted as G and D are attributed to the sp²-bonded carbon bonds of the GCE [5,6], the band denoted as M-S is associated to the AuNp-S stretching mode [3,4]. Laser power was 10mW.

S3. FT-IR spectroscopy of GCE/AuNp@cysteamine coated by PAMAM dendrimers

FT-IR spectra were performed for naked GCE (Fig.3-*i*), GCE/AuNp@cysteamine (Fig.3-*ii*) and GCE/AuNp@cysteamine/PAMAM (Fig.3-*iii*) systems by means of a Thermo-Nicolet Nexus FT-IR spectrometer, which was equipped with an accessory of specular reflectance (30°-angle). In comparison with the spectra obtained for the GCE/AuNp@cysteamine (Fig.3-*ii*) and naked GCE (Fig.3-*i*) systems, an inspection of the spectrum shown for the GCE/AuNp@cysteamine/PAMAM system (Fig.3-*iii*) reveals at

1740 cm^{-1} a vibrational peak attributed to the C=O stretching mode for the COOH groups localized at the outer rim of the PAMAM dendrimers [7]. This result clearly demonstrates that the system GCE/AuNp@cysteamine was chemically modified by dendritic micelles.

A more detailed comparison between the figures 3-*ii* and 3-*iii*, also allows discovering that the intensity for the vibrational signals attributed to amide I and II in the GCE/AuNp@cysteamine/PAMAM system were reasonably higher than for those observed in the GCE/AuNp@cysteamine system [8-10].

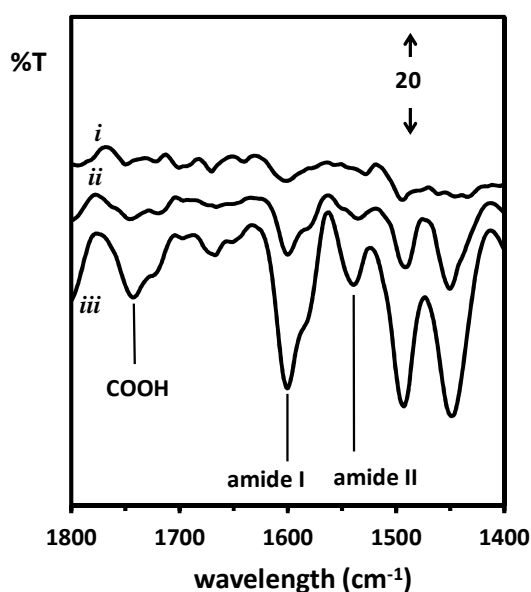


Fig.3 FT-IR spectra obtained for naked GCE (*i*), GCE/AuNp@cysteamine (*ii*) and GCE/AuNp@cysteamine/PAMAM systems at 25°C. While the vibrational bands denoted as amide I and II are attributed to the presence of amide linkages in the GCE/AuNp@cysteamine and GCE/AuNp@cysteamine/PAMAM systems [8-10], the band denoted as COOH is associated to the C=O stretching mode for the COOH groups localized at the outer rim of the PAMAM dendrimers topping the GCE/AuNp@cysteamine system [7].

S4. Roughness factor estimation for glassy carbon working electrodes

Roughness factor (r_f) was estimated for GCE by means of Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) by utilizing an IM6 BAS-Zahner Potentiostat-Galvanostat coupled to a 3-electrode electrochemical cell containing aqueous NaI 0.9N. Ag|AgCl (NaCl 3M) was used as the reference electrode, and a glassy carbon disc (3mm-diameter) and a

twisted platinum wire were employed as working- and counter-electrodes, respectively. All the experiments were carried out at 25°C. EIS spectrum shown in Fig.4 was obtained by applying a d.c. potential equal to the open-circuit-potential (o.c.p.) and an a.c. potential of $\pm 10\text{mV}$ which was scanned in a frequency window of 100kHz to 100mHz. The equivalent circuit shown in Fig.5 was loaded into ZviewTM v2.7 software by Scribner to fit to the experimental spectrum.

A detailed inspection of Fig.5A shows that the equivalent circuit includes the following electric elements: R_s is the electrolyte resistance and DXI (Bisquert#2) is an impedance element used for describing the impedance of porous electrodes [11]. In this element, resistances r_1 and r_2 are inversely proportional to the conductivities for the diffusive transport of electrolyte ions through the pores (σ_e) or through the interlayer spacing (σ_f) localized at the electrode microfibrils, respectively (Fig.5B). Complementary, capacitances c_3 and constant-phase-elements q_2 represent the ionic charge inserted into the respective phases. Finally, charge transfer resistance $R_{ct,p}$ and absorption capacitance $C_{ads,p}$ were added to this model to fit the behavior of the ionic charge confined into the bottom of the pores. All the fitted elements are presented in Table 1.

Next the electroactive area ($A_{e,GCE} = 0.11\text{cm}^2$) was computed by feeding the total interfacial capacitance C_T (Relationship 1) into Relationship 2, where C_{sp} ($\sim 13\mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ [14]) is the specific capacitance for GCE immersed in 0.9N NaF at 25°C. A roughness factor (r_f) of 1.5 was estimated by utilizing Relationship 3, where A_g is geometric (0.071cm^2) for GCE in good agreement with literature [15].

$$\frac{1}{C_T} = \frac{1}{C_2} + \frac{1}{C_3} + \frac{1}{C_{ads,p}} \quad (1)$$

$$A_{e,GCE} = \frac{C_T}{C_{sp}} \quad (2)$$

$$r_f = \frac{A_{e,GCE}}{A_g} \quad (3)$$

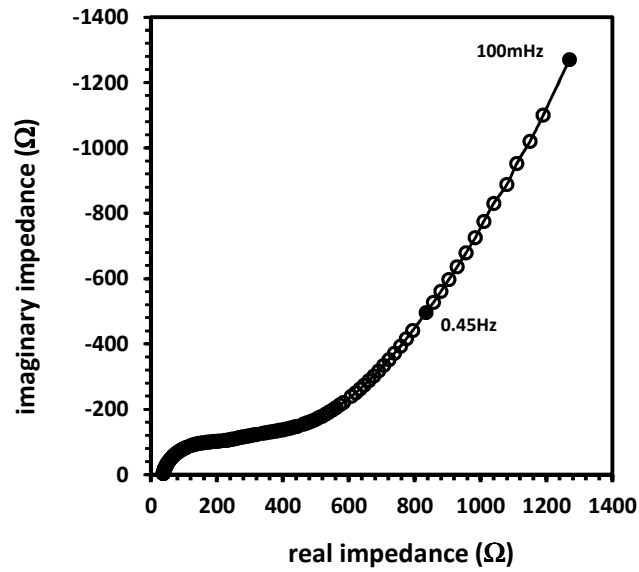


Fig.4 EIS spectrum obtained for a porous GCE immersed in 0.9N NaF at 25°C, where continuous line is the resulting fit for the equivalent circuit shown in Fig.5A.

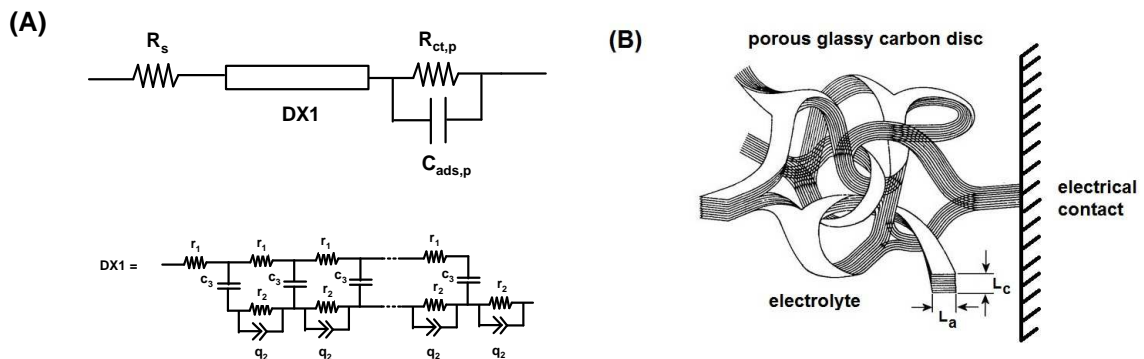


Fig.5 (A) Equivalent circuit fitted to the experimental spectrum shown in Fig.4 based on the Scheme (B), which represents the most accepted structure for a porous GCE, where “crystallite” size for the microfibrils randomly oriented is only $L_a(50\text{\AA}) \times L_c(15\text{\AA})$ [12] with an interlayer spacing of about 3.5\AA , thus suggesting that F^- anions (1.5\AA -ionic radius [13]) could be also adsorbed at the interlayer region.

Table 1

Electrical components fitted from EIS spectrum (Fig.4) by means of the equivalent circuit shown in Fig.5.

$R_s (\Omega)$	${}^a R_1 (\Omega)$	${}^b R_2 (k\Omega)$	${}^c C_2 (\mu F)$	$C_3 (mF)$	$R_{ct,p} (\Omega)$	$C_{ads,p} (\mu F)$
33.33±0.16	197.3±2.9	1.663±0.019	1.54±0.07	1.014±0.006	47.62±2.53	22.132±0.002

^a Average resistance obtained from the r_1 parameters described by DX1TM element [11]. ^b Average resistance obtained from the r_2 parameters described by DX1TM element [11]. ^c Average capacitance obtained from the constant-phase-elements q_2 included into DX1TM element [11].

S5. pK_a estimation for COOH terminal groups at PAMAM dendrimers generation 4.5

Apparent pK_a for the 128 COOH groups at the outer rim of PAMAM dendrimers generation 4.5 was estimated by utilizing the Relationship 4, where α is the degree of ionization of a polyacid according to Relationship 5 [16].

$$pK_a = pH + \log \frac{(1-\alpha)}{\alpha} \quad (4)$$

$$\alpha = \frac{[COO^-]}{[COOH] + [COO^-]} \quad (5)$$

Turro and coworkers [17] reported a carboxylate concentration $[COO^-]$ of 9.81×10^{-4} M for a dendrimer concentration [PAMAM gen 4.5] of 1.05×10^{-5} M, which is equivalent to a carboxylic acid concentration $[COOH]$ of 1.34×10^{-3} M based on the relationship $[COOH] = 128 \times [PAMAM \text{ gen } 4.5]$. A pK_a of 2.14 was estimated at pH 2 (Relationship 4) since $\alpha = 0.42$ (Relationship 5), which shows good agreement with the theoretical value ($pK_a=2.47$) which was computed using Relationship 4, after the number of peripheral COOH groups at the dendrimers ($N=128$) had been entered into Relationship 6 [18].

$$\alpha = \frac{N}{2(2N-2)} \quad (6)$$

S6. Electrodeposition of gold particles on GCE

Gold particles (AuP) were deposited on GCE (i.e. GCE/AuP) using the double-pulse potential technique (DPP) [19]. Experiments were performed by using an Epsilon BAS potentiostat connected to a 3-electrode electrochemical cell containing an aqueous solution of 1M KNO₃ + 1M HCl + 7.2mM HAuCl₄, where a twisted Pt wire was used as counter-electrode and potentials were referred to Ag|AgCl (3M NaCl) reference electrode. In this way, a nucleation pulse (E_{nucl}) of 0.35V was applied for 50ms, immediately followed by a 0.50V growth pulse (E_{growth}) for 10s. Both potentials were previously determined by CV (Fig.6) employing the same setup. All experiments were carried out at 25°C.

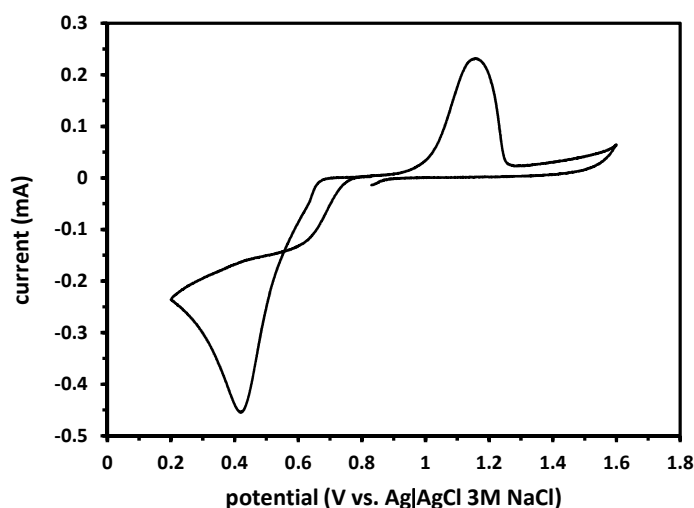


Fig.6 CV response obtained for the electrodeposition of Au particles (AuP) on GCE immersed in an aqueous solution of 1M KNO₃ + 1M HCl + 7.2mM HAuCl₄ at 25°C. Peaks observed at 0.42 and 1.20V correspond to deposition [20] and redissolution of AuP, respectively. Potential was scanned at 100mV·s⁻¹.

S7. Gold densities estimation for GCE/AuNp@cysteamine/PAMAM and GCE/AuP

Surface densities (Γ_{Au} , in mol·cm⁻²) for the gold confined on GCE/AuNp@cysteamine/PAMAM and GCE/AuP systems were estimated using Relationships 7 and 8, respectively. On one hand, N_{AuNp} (1.42×10^{10} particles) and D_{Au} (2.887 \AA [21]) in Relationship 7 represent the number of AuNp@cysteamine deposited on GCE and the gold atomic radius, respectively. On the other hand, Q_{Au} and F in Relationship

Γ represent the integrated charge under the anodic peak at Fig.6 and the Faraday's number (=96500 C·mol⁻¹), respectively.

$$\Gamma_{Au} = \frac{N_{AuNp} (D_{AuNp} / D_{Au})^3}{N_A r_f A_g} \quad (7)$$

$$\Gamma_{Au} = \frac{Q_{Au}}{3Fr_f A_g} \quad (8)$$

References.

- [1] B. Pan, F. Gao, L. Ao, H. Tian, R. He, D. Cui, *Colloids Surf. A* 259 (2005) 89-94.
- [2] R. Aroca, *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons, West Sussex, 2006.
- [3] F. Bensebaa, Y. Zhou, A.G. Brolo, D.E. Irish, Y. Deslandes, E. Kruus, T.H. Ellis, *Spectrochim. Acta A* 55 (1999) 1229-1236.
- [4] R.G. Nuzzo, B.R. Zegarski, L.H. Dubois, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 733-740.
- [5] Y. Wang, D.C. Alsmeyer, R.L. McCreery, *Chem. Mater.* 2 (1990) 557-563.
- [6] M.A. Pimenta, G. Dresselhaus, M.S. Dresselhaus, L.G. Cançado, A. Jorio, R. Saito, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9 (2007) 1276-1291.
- [7] V. Chechik, M. Zhao, R.M. Crooks, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 4910-4911.
- [8] M. Wells, R.M. Crooks, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 3988-3989.
- [9] H. Tokuhisa, R.M. Crooks, *Langmuir* 13 (1997) 5608-5612.
- [10] M.E. Garcia, L.A. Baker, R.M. Crooks, *Anal. Chem.* 71 (1999) 256-258.
- [11] J. Bisquert, G. Garcia-Belmonte, F. Fabregat-Santiago, A. Compte, *Electrochemistry Communications*. 1 (1999) 429-435.
- [12] F.C. Cowlard, J.C Lewis, *J. Mater. Sci.* 2 (1967) 507-512.
- [13] J. Kielland, *J. Am. Chem. Soc.* 59 (1937) 1675-1678.
- [14] A.G. Pandolfo, A.F. Hollenkamp, *J. Power Sources*. 157 (2006) 11-27.
- [15] M. G. Wier, V.S Myers, A.I Frenkel, R.M Crooks, *Chem. Phys. Chem.* 11 (2010) 2942-2950.

- [16] H. Zhang, P.L. Dubin, J. Kaplan, C.N Moorefield, G.R. Newkome, *J. Phys. Chem. B.* 101 (1997) 3494-3497.
- [17] S. Jockusch, N.J. Turro, D. A. Tomalia, *Macromolecules.* 28 (1995) 7416-7418.
- [18] R.C. van Duijvenbode, A. Rajanayagam, G.J.M Koper, M.W.P.L Baars, B.F.M. de Waal, E.W. Meijer, M. Borkovec, *Macromolecules.* 33 (2000) 46-52.
- [19] M. Ueda, H. Dietz, A. Anders, H. Knepe, A. Meixner, W. Plieth, *Electrochim. Acta.* 48 (2002) 377-386.
- [20] M.O. Finot, G.D. Braybrook, M.T. McDermott, *J. Electroanal. Chem.* 466 (1999) 234-241.
- [21] H. Angerstein-Kozłowska, B.E. Conway, A. Hamelin, L. Stoicoviciu, *Electrochim. Acta.* 31 (1986) 1051-1061.

REFERENCIAS

1. McKee T, McKee JR (2003) Bioquímica: la base molecular de la vida. McGraw-Hill, Interamericana
2. Arderiu XF (1998) Bioquímica clínica y patología molecular. Reverte
3. So A, Thorens B (2010) Uric acid transport and disease. *Journal of Clinical Investigation* 120:1791.
4. Pérez L, Moreno González, Leza, Lizasoain Hernández, Moro Sánchez, Portolés, Fernández PL Velázquez. *Farmacología Básica y Clínica*. Ed. Médica Panamericana
5. Schultz A. Uric acid. Kaplan A et al. *Clin Chem The C.V.* Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1261-1266 and 418.
6. Heinig M, Johnson RJ (2006) Role of uric acid in hypertension, renal disease, and metabolic syndrome. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 73:1059–1064.
7. World Health Organization (2011) WHO recommendations for prevention and treatment of pre-eclampsia and eclampsia.
8. México. Secretaria de Salud. Dirección General de Salud Reproductiva (2007) *Prevención, Diagnostico y Manejo de la Preeclampsia/Eclampsia*. Lineamiento Técnico. Secretaria de Salud, D.F
9. Vázquez-Rodríguez JG, Rico-Trejo EI. Papel del ácido úrico en la preeclampsia-eclampsia. *Ginecol Obstet Mex* 2011;79(5):292-297.
10. Davison JM, Dunlop W (1980) Renal hemodynamics and tubular function in normal human pregnancy. *Kidney International* 18:152–161.
11. Koopmans CM, van Pampus MG, Groen H, et al. (2009) Accuracy of serum uric acid as a predictive test for maternal complications in pre-eclampsia: Bivariate meta-analysis and decision analysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 146:8–14.

12. Many A, Hubel CA, Roberts JM (1996) Hyperuricemia and xanthine oxidase in preeclampsia, revisited. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 174:288–291.
13. G. Bellomo, S. Venanzi, P. Saronio, C. Verdura, P. Luca-Narducci, *Hypertension* 58(2011) 704-708.
14. Jackson H, Palmer WW (1922) A Modification of Folin's Colorimetric Method for the Determination of Uric Acid. *J Biol Chem* 50:89–101.
15. Lum, G., & Gambino, S. R. (1973). Comparison of four methods for measuring uric acid: copper-chelate, phosphotungstate, manual uricase, and automated kinetic uricase. *Clinical chemistry*, 19(10), 1184-1186.
16. Carroll JJ, Coburn H, Douglass R, Babson AL (1971) A simplified alkaline phosphotungstate assay for uric acid in serum. *Clin Chem* 17:158–160.
17. Bulger, H. A., & Johns, H. E. (1941). The determination of plasma uric acid. *Journal of Biological Chemistry*, 140(2), 427-440.
18. Schultz A. Uric acid. Kaplan A et al. *Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton* 1984; 1261-1266 and 418.
19. Bard, A. J., & Faulkner, L. R. (1980). *Electrochemical methods: fundamentals and applications* (Vol. 2). New York: Wiley.
20. Pickup JC (1985) BIOSENSORS: A CLINICAL PERSPECTIVE J. C. PICKUP. *The Lancet* 326:817–820.
21. Guerasimov Y (1980) *Curso de química física: II*. Mir
22. Chaubey A, Malhotra BD (2002) Mediated biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 17:441–456.
23. Grieshaber, D., MacKenzie, R., Voeroes, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical biosensors-Sensor principles and architectures. *Sensors*, 8(3), 1400-1458.
24. Bakker, E., & Pretsch, E. (2005). Potentiometric sensors for trace-level analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24(3), 199-207.
25. Wang J (2006) *Analytical Electrochemistry* John Wiley & Sons

26. Pandolfo AG, Hollenkamp AF (2006) Carbon properties and their role in supercapacitors. *Journal of Power Sources* 157:11–27.
27. Van der Linden WE, Dieker JW (1980) Glassy carbon as electrode material in electro- analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta* 119:1–24.
28. Yamada S, Sato H (1962) Some Physical Properties of Glassy Carbon. *Nature* 193:261–262.
29. Randin J-P, Yeager E (1975) Differential capacitance study on the edge orientation of pyrolytic graphite and glassy carbon electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 58:313–322.
30. Laser D, Ariel M (1974) The anodic behavior of glassy carbon in acid solution: A spectroelectrochemical study. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 52:291–303.
31. Dieker JW, van der Linden WE, Poppe H (1978) Behaviour of solid electrodes in normal and differential pulse voltammetric methods. *Talanta* 25:151–155
32. Majer V, Veselý J, Štulík K (1973) The potentiometric response of some carbonaceous electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 45:113–125.
33. Kamau GN, Willis WS, Rusling JF (1985) Electrochemical and Electron Spectroscopic Studies of Highly Polished Glassy Carbon Electrodes. *Analytical Chemistry*.
34. Zhang H, Coury LA (1993) Effects of high-intensity ultrasound on glassy carbon electrodes. *Anal Chem* 65:1552–1558.
35. Fagan DT, Hu IF, Kuwana T (1985) Vacuum heat-treatment for activation of glassy carbon electrodes. *Anal Chem* 57:2759–2763.
36. Bowling RJ, Packard RT, McCreery RL (1989) Activation of highly ordered pyrolytic graphite for heterogeneous electron transfer: relationship between electrochemical performance and carbon microstructure. *J Am Chem Soc* 111:1217–1223.

37. Zhao Q-L, Zhang Z-L, Bao L, Pang D-W (2008) Surface structure-related electrochemical behaviors of glassy carbon electrodes. *Electrochemistry Communications* 10:181–185.
38. Engstrom RC (1982) Electrochemical pretreatment of glassy carbon electrodes. *Anal Chem* 54:2310–2314. doi: 10.1021/ac00250a038
39. Engstrom RC, Strasser VA (1984) Characterization of electrochemically pretreated glassy carbon electrodes. *Anal Chem* 56:136–141.
40. Murray RW (1980) Chemically modified electrodes. *Acc Chem Res* 13:135–141.
41. *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 69, No. 6, pp. 1317-1323, 1997.
42. Koryta J, Dvorak J, Kavan L, *Principles of Electrochemistry*. John Wiley. West Sussex, 1993
43. Murray RW, Ewing AG, Durst RA (1987) Chemically Modified Electrodes Molecular Design for Electroanalysis. *Anal Chem* 59:379A–390A.
44. Huang X-J, Im H-S, Yarimaga O, et al. (2006) Direct Electrochemistry of Uric Acid at Chemically Assembled Carboxylated Single-Walled Carbon Nanotubes Netlike Electrode. *J Phys Chem B* 110:21850–21856.
45. Lin L, Chen J, Yao H, et al. (2008) Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid at poly (Evans Blue) modified glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry* 73:11–17.
46. Qiao JX, Luo HQ, Li NB (2008) Electrochemical behavior of uric acid and epinephrine at an electrochemically activated glassy carbon electrode. *Colloids Surf B Biointerfaces* 62:31–35.
47. Temoçin Z (2013) Modification of glassy carbon electrode in basic medium by electrochemical treatment for simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid. *Sensors and Actuators B: Chemical* 176:796–802.
48. Bi H, Li Y, Liu S, et al. (2012) Carbon-nanotube-modified glassy carbon electrode for simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid: The effect of functional groups. *Sensors and Actuators B: Chemical* 171–172:1132–1140.

49. Zare HR, Nasirizadeh N (2010) Simultaneous determination of ascorbic acid, adrenaline and uric acid at a hematoxylin multi-wall carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical* 143:666–672.
50. Katz E, Willner I, Wang J (2004) *Electroanalytical and Bioelectroanalytical Systems Based on Metal and Semiconductor Nanoparticles*. *Electroanalysis* 16:19–44.
51. Guo S, Wang E (2007) Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta* 598:181–192.
52. Tang Y, Cheng W (2013) Nanoparticle-Modified Electrode with Size- and Shape-Dependent Electrocatalytic Activities. *Langmuir* 29:3125–3132.
53. Liu S, Yan J, He G, et al. (2012) Layer-by-layer assembled multilayer films of reduced graphene oxide/gold nanoparticles for the electrochemical detection of dopamine. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 672:40–44.
54. Li J, Lin X-Q (2007) Electrodeposition of gold nanoclusters on overoxidized polypyrrole film modified glassy carbon electrode and its application for the simultaneous determination of epinephrine and uric acid under coexistence of ascorbic acid. *Analytica Chimica Acta* 596:222–230.
55. Hu G, Ma Y, Guo Y, Shao S (2008) Electrocatalytic oxidation and simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid on the gold nanoparticles-modified glassy carbon electrode. *Electrochimica Acta* 53:6610–6615.
56. Tomalia DA, Baker H, Dewald J, et al. (1985) A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polym J* 17:117–132.
57. M. Calderon, M. Strumia, *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales* 33 (2013), 2–14.
58. M.H. Kleinman, J.M. Flory, D.A. Tomalia, N.J. Turro, (2000) Effect of Protonation and PAMAM Dendrimer Size on the Complexation and Dynamic Mobility of 2-Naphthol, *J. Phys. Chem. B*, 104, 11472-11479

59. Erika Bustos Bustos MGGJ (2007) Glassy carbon electrodes modified with composites of starburst-PAMAM dendrimers containing metal nanoparticles for amperometric detection of dopamine in urine. *Talanta* 72:1586–92.
60. Ramírez Segovia Alejandra Sarahi, 2012, *Construcción de Electrodo Modificados y su Aplicación en la Detección de Ácido Úrico*. Guanajuato, Gto.: Universidad de Guanajuato división de ciencias naturales y exactas campus Guanajuato
61. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J (1951) A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc* 11:55–75
62. Pan B, Gao F, Ao L, et al. (2005) Controlled self-assembly of thiol-terminated poly(amidoamine) dendrimer and gold nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 259:89–94.
63. Aroca, R. *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy* 2006, John Wiley & Sons, West Sussex, p. 147
64. Aryal S, B.K.C. R, Dharmaraj N, et al. (2006) Spectroscopic identification of S-Au interaction in cysteine capped gold nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 63:160–163.
65. Lojou E, Bianco P (2006) Assemblies of dendrimers and proteins on carbon and gold electrodes. *Bioelectrochemistry* 69:237–247.
66. Deinhammer RS, Ho M, Anderegg JW, Porter MD (1994) Electrochemical oxidation of amine-containing compounds: a route to the surface modification of glassy carbon electrodes. *Langmuir* 10:1306–1313.
67. Bustos E, Manríquez J, Orozco G, Godínez LA (2005) Preparation, Characterization, and Electrocatalytic Activity of Surface Anchored, Prussian Blue Containing Starburst PAMAM Dendrimers on Gold Electrodes. *Langmuir* 21:3013–3021.
68. Angerstein-Kozłowska H, Conway BE, Hamelin A, Stoicoviciu L (1986) Elementary steps of electrochemical oxidation of single-crystal planes of Au-I. Chemical basis of

processes involving geometry of anions and the electrode surfaces. *Electrochimica Acta* 31:1051–1061.

69. V. Chechik, M. Zhao, R.M. Crooks (1999) Self-Assembled Inverted Micelles Prepared from a Dendrimer Template: Phase Transfer of Encapsulated Guests *J. Am. Chem. Soc.* 121 4910-4911.

70. M. Wells, R.M. Crooks, (1996) Interactions between Organized, Surface-Confined Monolayers and Vapor-Phase Probe Molecules. 10.Preparation and Properties of Chemically Sensitive Dendrimer Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* 118 3988-3989.

71. Nathan MI, Jr JES, Tu KN (1974) Raman spectra of glassy carbon. *Journal of Applied Physics* 45:2370–2370.

72. Rastogi L, Kora AJ, J. A (2012) Highly stable, protein capped gold nanoparticles as effective drug delivery vehicles for amino-glycosidic antibiotics. *Materials Science and Engineering: C* 32:1571–1577.

73. Goswami AM (2013). *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* 04:20–27.

74. Dávila-Martínez RE, Cueto LF, Sánchez EM (2006) Electrochemical deposition of silver nanoparticles on TiO₂/FTO thin films. *Surface Science* 600:3427–3435.

75. Skoog DA, Crouch SR, Holler FJ (2008) *Principios de análisis instrumental*. Cengage Learning Latin America

76. Sharma SK, Suman, Pundir CS, et al. (2006) Galactose sensor based on galactose oxidase immobilized in polyvinyl formal. *Sensors and Actuators B: Chemical* 119:15–19

77. A. Scheludko and M. Todorova, *Bull. Acad. Bull. Sci. Phys.* 3(1952).

78. H. Liu and R.M. Penner, *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 9131.

79. J. Bisquert, G. Garcia-Belmonte, F. Fabregat-Santiago, A. Compte, *Electrochemistry Communications*. 1 (1999) 429-435.

80. F.C. Cowlard, J.C Lewis, *J. Mater. Sci.* 2 (1967) 507-512.

81. J. Kielland, *J. Am. Chem. Soc.* 59 (1937) 1675-1678.

82. A.G. Pandolfo, A.F. Hollenkamp, *J. Power Sources*. 157 (2006) 11-27.

83. M. G. Wier, V.S Myers, A.I Frenkel, R.M Crooks, Chem. Phys. Chem. 11 (2010) 2942-2950.