

**DESARROLLO DE UN BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO  
ENZIMÁTICO MEDIANTE NANOTUBOS DE CARBONO  
MODIFICADOS CON HIDROXIAPATITA PARA LA DETECCIÓN DE  
MOLÉCULAS DE INTERÉS BIOLÓGICO**

**DEVELOPMENT OF AN ENZYMATIC ELECTROCHEMICAL  
BIOSENSOR USING HYDROXYAPATITE MODIFIED CARBON  
NANOTUBES FOR BIOLOGICAL INTEREST MOLECULES  
DETECTION**

Jocelyne Alvarez-Paguay<sup>1</sup>, Diego Bolaños-Mendez.<sup>1</sup>, Lenys Fernández Martínez.<sup>1\*</sup>, Gema González.<sup>2</sup> & Patricio J. Espinoza-Montero.<sup>1</sup>

**Palabras claves:** Azul de Prusia; Biosensor electroquímico; Hidroxiapatita; Nanotubos de carbono; Peróxido de hidrógeno; Peroxidasa de rábano.

**Keywords:** Carbon Nanotubes; Electrochemical biosensor, Horseradish peroxidase; Hydroxyapatite; Peroxide hydrogen; Prussian blue.

**RESUMEN**

En el presente trabajo se reporta la determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por medio de dos biosensores electroquímicos a base de electrodos de carbono vítreo (GC, por sus siglas en inglés) modificados con nanotubos de carbonos (NTC<sub>f</sub>) modificados con hidroxiapatita (HAp), azul de prusia (PB, por sus siglas en inglés) y peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés), para conformar los biosensores PB/HAp-NTC<sub>f</sub>/GC y HRP/HAp-NTC<sub>f</sub>/GC, respectivamente. La síntesis de HAp sobre las paredes de los NTC<sub>f</sub> se llevó a cabo por el método fluido corporal simulado. Se sintetizaron materiales de dos tamaños de partícula, HAp5 y HAp20, correspondientes a tiempos de envejecimiento de 5 y 20 días, respectivamente. Los materiales se caracterizaron por microscopia electrónica de transmisión, espectroscopia infrarroja por

---

<sup>1</sup> Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Escuela de Ciencias Químicas, Quito, Ecuador (jalvarez2p@outlook.es; diegogovanny222@hotmail.es; \*correspondencia: lmfernandez@puce.edu.ec; pespinoza646@puce.edu.ec).

<sup>2</sup> Yachay Tech University, School of Physics and Nanotechnology, Urququi 100650, Ecuador (ggonzalez@yachaytech.edu.ec)

transformadas de Fourier y difracción de rayos X. La detección de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se llevó a cabo por cronoamperometría. El rango lineal obtenido para el sensor PB/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC fue de  $1,8 \times 10^{-4}$  -  $2,7 \times 10^{-3}$  M, con un límite de detección de 26,8  $\mu\text{M}$ ; para el biosensor PB/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC el rango lineal fue de  $1,8 \times 10^{-4}$  -  $3,5 \times 10^{-3}$  M y un límite de detección de 90,8  $\mu\text{M}$ . Con respecto a los biosensores enzimáticos, el electrodo HRP/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC presentó un rango lineal de  $1,0 \times 10^{-5}$  -  $2,34 \times 10^{-4}$  M, cuyo límite de detección alcanzado fue de 1,9  $\mu\text{M}$ ; mientras que para el HRP/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC el rango lineal fue  $1,0 \times 10^{-5}$  -  $2,34 \times 10^{-4}$  M, con un límite de detección de 4,4  $\mu\text{M}$ . La constante aparente de Michaelis-Menten obtenida para ambos sensores indican que la HRP mantiene su actividad enzimática sobre ambos electrodos.

## ABSTRACT

The present work reports the determination of  $\text{H}_2\text{O}_2$  with two electrochemical biosensors based at glassy carbon electrodes (GC) modified with hydroxyapatite (HAp) modified carbon nanotubes (CNT), Prussian blue (PB) and horseradish peroxidase (HRP), to develop the PB/HAp-NTC<sub>f</sub>/GC and HRP/HAp-NTC<sub>f</sub>/GC biosensors, respectively. The synthesis of HAp on the CNT<sub>f</sub> was carried out by the simulated body fluid method. Materials of two particle sizes, HAp5 and HAp20, corresponding to aging times of 5 and 20 days, respectively, were synthesized. The materials were characterized by transmission electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy and X-ray diffraction. The detection of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was carried out by chronoamperometry. The linear range obtained for the PB/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC sensor was  $1.8 \times 10^{-4}$  -  $2.7 \times 10^{-3}$  M with a detection limit of 26.8  $\mu\text{M}$ ; for the PB/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC biosensor the linear range was  $1.8 \times 10^{-4}$  -  $3.5 \times 10^{-3}$  M and a detection limit of 90.8  $\mu\text{M}$ . With respect to the enzymatic biosensors, the HRP/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC electrode presented a linear range of  $1.0 \times 10^{-5}$  -  $2.34 \times 10^{-4}$  M, whose detection limit reached was 1.9  $\mu\text{M}$ ; while for HRP PB/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC the linear range was  $1.0 \times 10^{-5}$  -  $2.34 \times 10^{-4}$  M, with a detection limit of 4.4  $\mu\text{M}$ . The apparent Michaelis-Menten constant obtained for both sensors show that HRP maintains its enzymatic activity at both electrodes.

## INTRODUCCIÓN

Los biosensores electroquímicos, combinan la sensibilidad de los métodos electroquímicos con la selectividad de sistemas de reconocimiento biológico. El biosensor reconoce al analito, el cual participa en la reacción biocatalítica dando como resultado una señal eléctrica monitoreada por un transductor. Muchos de estos dispositivos se han comercializado y, utilizado de manera rutinaria en aplicaciones clínicas, ambientales, industriales y agrícolas (Gutiérrez *et al.*, 2011). En bioquímica clínica, los biosensores se han aplicado en la detección de moléculas como glucosa, ácido fólico, dopamina, ácido úrico y peróxidos (Ronkainen *et al.*, 2010; Thirumalraj *et al.*, 2016). Particularmente, el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es una molécula pequeña con un gran rol en diversos procesos biológicos como la activación de células inmunes, remodelación vascular y cierre de estomas. Además, de ser de gran importancia en aplicaciones farmacéuticas, clínicas, ambientales, mineras, alimenticias e industriales (Narwal *et al.*, 2018; Palanisamy *et al.*, 2019; Tsiafoul *et al.*, 2005). Entre las técnicas analíticas más utilizadas para la determinación de  $H_2O_2$  se encuentra la fluorescencia,

quimioluminiscencia y electroquímica; siendo esta última muy atractiva debido a sus bajos límites de detección, alta sensibilidad, selectividad y facilidades para la portabilidad (Chen *et al.*, 2012; Thirumalraj *et al.*, 2016; Thirumalraj *et al.*, 2019; Yuan *et al.*, 2018). Las técnicas electroquímicas son muy utilizadas en el diseño y construcción de biosensores enzimáticos y no enzimáticos, donde los biosensores electroquímicos enzimáticos para  $H_2O_2$ , se han estudiado ampliamente debido a ventajas como sencillos de construir y alta selectividad (Ahmad *et al.*, 2010; Alim, *et al.*, 2019; Gutierrez, *et al.*, 2019; Kišija, *et al.*, 2020; Komkova *et al.*, 2019; Kucherenko *et al.*, 2019; Raphey *et al.*, 2019; Roointan *et al.*, 2019; Sabu, *et al.*, 2019).

El rendimiento óptimo de un biosensor electroquímico enzimático depende de la inmovilización exitosa de la enzima sobre la superficie sensora (electrodo), por lo que el desarrollo de materiales simples y confiables para lograrlo es crucial. La combinación de materiales orgánico-inorgánico, es una de las áreas potencialmente emergentes en esta nanotecnología; su sinergia beneficia la inmovilización superficial de sistemas de reconocimiento biológicos, como las

enzimas, ya que los materiales orgánicos favorecen formación de membranas inorgánicas sin defectos, menos frágiles y mejoran la estabilidad bioquímica y térmica de la fase inorgánica (Komkova, et al., 2019; Rairán & Casallas, 2018; Roointan et al., 2019).

Los nanotubos de carbono (NTCs), contribuyen a la nueva generación de materiales utilizados en biosensores ultrarrápidos y ultrasensibles debido a su gran área superficial, sus excelentes propiedades eléctricas, estabilidad mecánica y su alta capacidad de transferencia electrónica (Sianipar et al., 2017). Además, la modificación de sus paredes con materiales nanoparticulados biocompatibles mejorarán las propiedades de estos para inmovilizar enzimas. Entre los materiales más utilizados, están nanopartículas de ZnO (Ahmad, Pan, Luo, & Zhu, 2010; Hang et al., 2019), Au (Thirumalraj et al., 2016), TiO<sub>2</sub> (Bai & Zhou, 2014; Liu et al., 2017; Zhang et al., 2011), ZrO<sub>2</sub> (Bai & Zhou, 2014; Chen et al., 2013; Reddy et al., 2011) y HAp (Gao et al., 2016).

La HAp es un compuesto inorgánico, Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>, utilizado como portador de genes y enzimas, debido a su estructura porosa y excelente biocompatibilidad

(Wang, et al., 2009). Por otro lado Wang, et al. (2017), ha demostrado que el uso de Azul de Prusia (PB, por sus siglas en inglés) como mediador redox presenta buena actividad catalítica en la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> debido a su comportamiento redox muy semejante a las peroxidasas. Moyo, et al. (2013), han determinado que el uso de peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) adsorbida sobre un composito de borlas de maíz (MT, por sus siglas en inglés) y nanotubos de carbono multi-pared (NTC-MP) sobre un electrodo de carbón vítreo (GC, por sus siglas en inglés) exhibe una buena reproducibilidad y estabilidad para la determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Según, Xu, et al. (2015), han inmovilizado HRP sobre un electrodo desechable de pantalla impresa (SPE, por sus siglas en inglés) modificado con NTCs, obteniendo una alta afinidad biológica hacia la HRP y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Como ha reportado Wang et al., (2009) y Ma et al., (2009), la HAp es un biomaterial que favorece la inmovilización de enzimas como el HRP sobre superficies sensoras electroquímicas (electrodo). En el presente trabajo, se presenta la modificación de electrodos de GC con NTC modificados con nanopartículas de HAp y su aplicación en la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como biosensor

electroquímico enzimático. Para llevar a cabo la investigación, se inició con la inmovilización de PB, el cual es considerado como una peroxidasa artificial, sobre el electrodo modificado HAp-NTC/GC, un sistema simple que permitió optimizar de manera más certera la superficie sensora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> HRP-HAp-NTC/GC.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Instrumentación

Baño de ultrasonido Branson 3800; Potenciostato Biologic SP-150, software EC-Lab V11.26, celda electroquímica de un compartimento, electrodo de GC como electrodo de trabajo, electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia y mina de grafito como contraelectrodo; pH-metro Metler Toledo; Difractómetro SIMENS D5005 (a una longitud de onda ( $\lambda$ ) igual a 1,54178 Å en un rango de  $2\theta = 10^\circ - 80^\circ$  a una velocidad de 0.02°/0.52s); espectrómetro FTIR Nicolet iS10 (empleando 64 barridos a una resolución de 2 cm<sup>-1</sup>); microscopio JEOL 1220 (a un voltaje de 100kV y 200kV).

### Reactivos

Cloruro de potasio, 99,99% (Fischer; Grado Analítico); ácido clorhídrico, 37% V/V (Fischer Scientific; Grado Analítico); ácido sulfúrico, 9% (Fischer; Grado Analítico); fosfato dipotásico, 99,99% (Merck, Grado Analítico); fosfato monopotásico, 99,99% (Merck, Grado Analítico) y ferricianuro de potasio, 99,99% (Merck, Grado Analítico); cloruro férrico hexahidratado; poli-cloruro de dialildimetilamonio (PDDA), Sigma-Aldrich; N,N-Dimetilformamida (DMF), Sigma-Aldrich; carbón vítreo (GC, diámetro 3 mm, área geométrica 0,0706 cm<sup>2</sup>), CH-Instruments; peróxido de hidrógeno, 30% V/V (Sigma-Aldrich Sigma); kit de limpieza 0,3  $\mu\text{m}$  y 0,05  $\mu\text{m}$ , (CH-Instruments, Inc); peroxidasa de rábano picante, 250 U·mg<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich). Cada ensayo se desgasificó con un burbujeo de nitrógeno 5.0 durante 5 minutos.

### Funcionalización de NTCs

Para la funcionalización de los NTCs se siguió el procedimiento realizado en previos trabajos (Gonzalez et al., 2011), donde, inicialmente se ha pre-funcionalizado 1,0 g de NTCs en 3 mol·L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> y 1 mol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en proporción 3:1 bajo reflujo y agitación magnética a 80°C durante 6 h, se filtró, se lavó en H<sub>2</sub>O desionizada, se secó al vacío a 60 °C por 12 h y finalmente se molieron en un mortero para la

funcionalización (formación de grupos carboxilo e hidroxilo en las paredes) mezclando los NTCs pre-funcionalizados y 80 mL de  $\text{HNO}_3$  bajo agitación ultrasónica por 30 s. Esta mezcla se colocó en reflujo a  $80\text{ }^\circ\text{C}$  por 2 horas, seguida de una dilución con  $\text{H}_2\text{O}$ , filtración y secado a  $60\text{ }^\circ\text{C}$  por 16 h para finalmente moler los nanotubos de carbono funcionalizados,  $\text{NTC}_f$ , para hacerlos pasar por un tamiz con un tamaño de partícula de  $125\text{ }\mu\text{m}$ .

### **Síntesis del material nanoestructurado HAp/ $\text{NTC}_f$**

El recubrimiento de las paredes de los  $\text{NTC}_f$  por HAp, se realizó mediante precipitación química. Se colocaron 80 mg de  $\text{NTC}_f$  en una solución de fluido corporal simulado (SBF, por sus siglas en inglés) y se selló el recipiente, se colocó en un baño de agua a una temperatura de  $35$  a  $42\text{ }^\circ\text{C}$  durante 5 y 20 días. Seguido de una separación por decantado de la muestra. Finalmente se secó al vacío a  $60\text{ }^\circ\text{C}$  durante 14 horas (Morimune-Moriya et al., 2015).

### **Preparación de los electrodos modificados**

#### **Electrodo HAp- $\text{NTC}_f$ /GC**

Se preparó una suspensión de HAp/ $\text{NTC}_f$  en DMF, con una concentración de  $5,0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

<sup>1</sup> y se sonificó por 1 h, la cual se conservó a temperatura ambiente ( $\sim 20\text{ }^\circ\text{C}$ ).

Para modificar del electrodo de GC, se agregó por goteo  $10\text{ }\mu\text{L}$  de la suspensión de HAp/ $\text{NTC}_f$  sobre su superficie. El electrodo se dejó secar bajo luz infrarroja.

#### **Electrodo PB-HAp/ $\text{NTC}_f$ /GC**

Para la preparación del electrodo PB/HAp- $\text{NTC}_f$ /GC, se llevó a cabo la electrodeposición de PB sobre el electrodo HAp- $\text{NTC}_f$ /GC mediante Cronoamperometría (CA), en una solución de  $2,5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] + 2,5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O} + 0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ HCl} + 0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ KCl}$  a un potencial de  $0,4\text{ V vs. Ag/AgCl}$  por un tiempo de deposición de 4 min. Posteriormente se realizó la activación y estabilización del electrodo por voltamperometría cíclica (VC) en un rango de potencial de  $-0,1$  a  $-0,45\text{ V}$  a una velocidad de barrido de  $50\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , en solución de  $0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ HCl} + 0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ KCl}$  por 8 ciclos y se estabilizó por VC en un rango de  $0,0\text{ V} - 0,4\text{ V}$  a una velocidad de barrido de  $50\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $100\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  y  $120\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  en solución de  $0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de fosfato buffer (PBS). Antes de realizar las pruebas electroquímicas, se dejó secar a  $45\text{ }^\circ\text{C}$  y luego se agregó  $6\text{ }\mu\text{L}$  de PDDA a su superficie, para finalmente secarlo bajo luz infrarroja por 20 min.

### Electrodo HRP/HAp-NTC<sub>f</sub>/GC

La preparación del electrodo de HRP/HAp-NTC<sub>f</sub>/GC, se realizó agregando por goteo 10 µL de la suspensión de HAp-NTC<sub>f</sub> sobre la superficie del GC. El electrodo se dejó secar durante 20 min a 45 °C y luego de este periodo de secado se adicionó a la superficie 10 µL de 5,0 mg·mL<sup>-1</sup> HRP. Con esta última modificación el electrodo se dejó secar a temperatura de 4 °C por 12 horas y se conservó a 4 °C previamente a los ensayos electroquímicos.

### Caracterización electroquímica

Los experimentos a diferentes velocidades de barrido se llevaron a cabo por medio de VC en solución 5 mM de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>/K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> + 0,1 mol·L<sup>-1</sup> de PBS, en un rango de velocidades de 10 a 120 mV·s<sup>-1</sup>. Utilizando la ecuación de Randles-Sevick (Ec. 1) se calculó el área efectiva del electrodo:

$$I_p = 0.265 \times 10^5 A C \nu^{1/2} D^{1/2} \quad (1)$$

Donde,  $I_p$  es la corriente pico,  $A$  es el área en cm<sup>2</sup>,  $\nu$  es la velocidad de barrido y  $D$  es el coeficiente de difusión.

La capacitancia electroquímica de cada electrodo modificado se obtuvo mediante VC en solución 0,1 mol·L<sup>-1</sup> PBS (pH 7,0) y a potenciales de -0,3 a 0,3 V. De acuerdo con la siguiente ecuación (Ec. 2):

$$j = I_c/A = C_{dl} \nu \quad (2)$$

Donde,  $C_{dl}$  es la capacitancia de doble capa,  $I_c$  la corriente y  $j$  la densidad de corriente.

La concentración superficial ( $\Gamma_c$ ) de PB sobre el electrodo se calculó mediante la ecuación (Ec. 3):

$$I_p = \frac{n^2 F^2 A \nu \Gamma_c}{4RT} \quad (3)$$

Donde,  $n$  es número de electrones transferidos en el proceso redox,  $F$  es la constante de Faraday,  $R$  es la constante de los gases y  $T$  es la temperatura.

### Determinación de peróxido de hidrógeno

Previo a la obtención de las curvas de calibración para la cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se realizaron pruebas diagnóstico mediante VC para determinar la señal de respuesta del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en soluciones 0,1 mol·L<sup>-1</sup> de este analito en PBS, a un rango de potencial de -0,10 a 0,50 V y una velocidad de barrido de 50 mV s<sup>-1</sup>.

Para evaluar la sensibilidad y linealidad de la respuesta de los electrodos modificados al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se realizaron mediciones cronoamperométricas en solución PBS, pH 7,0 previa agitación. Se añadieron alícuotas de 0,1 mol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cada 20 s. Los experimentos se llevaron a cabo manteniendo la temperatura a 4 °C ± 2.

Se evaluó la constante aparente de Michaelis-Menten,  $K_m^{app}$ , de acuerdo a la (Ec. 4) (Yang, et al., 2004).

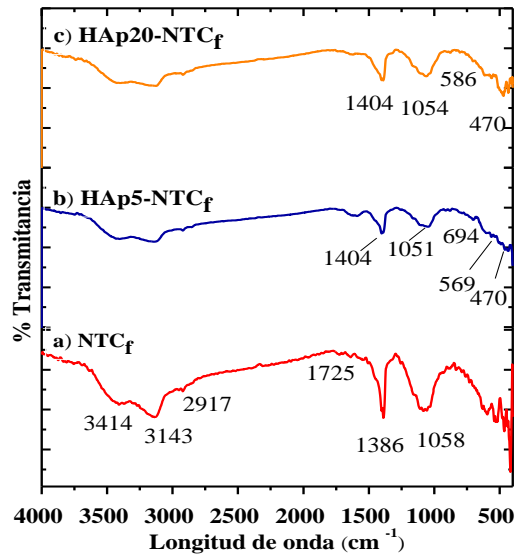
$$\frac{1}{I_s} = \frac{1}{I_{max}} + \frac{K_m^{app}}{I_{max} C} \quad (4)$$

Donde,  $I_s$  es la corriente límite,  $I_{max}$  es la corriente máxima bajo condiciones saturadas y  $C$  es la concentración del sustrato,  $H_2O_2$ .

## RESULTADOS

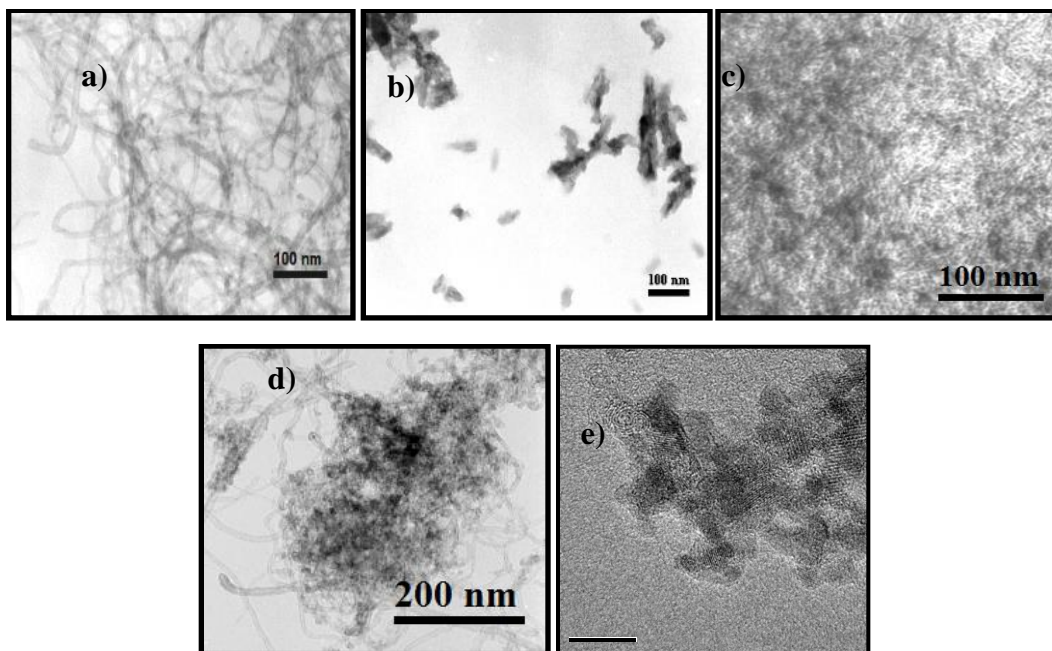
### Caracterización de los NTC<sub>f</sub>

La Figura 1, muestra espectros FT-IR donde pueden observarse picos característicos de los NTC<sub>f</sub>, HAp5-NTC<sub>f</sub>, envejecidos por 5 días, y los HAp20-NTC<sub>f</sub>, envejecidos por 20 días.



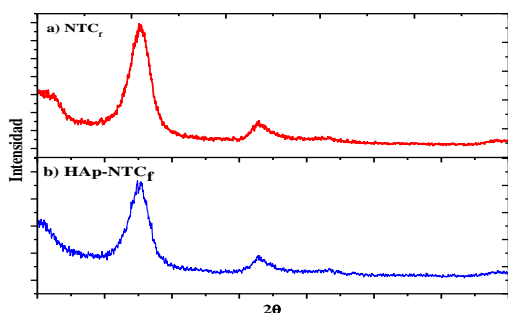
**Figura 1. Espectro FTIR de a) NTC<sub>f</sub>, b) HAp5-NTC<sub>f</sub> y c) HAp20-NTC<sub>f</sub>.**

En la Figura 2 se muestran las micrografías TEM para cada uno de los materiales utilizados, donde se puede observar la estructura superficial de los NTC<sub>f</sub> de forma tubular (Figura 2a), la HAp en forma alargada y aglomeradas (Figura 2b), la presencia de una película con pequeñas partículas de HAp sobre los NTC<sub>f</sub> (Figura 2c) y la aglomeración de partículas de HAp sobre los NTC<sub>f</sub> (Figura 2d y 2e).



**Figura 2. Micrografía TEM de: a) NTCf b) HAp sintetizada, c) HAp5-NTCf, d) HAp20-NTCf y e) ampliación HAp20-NTCf**

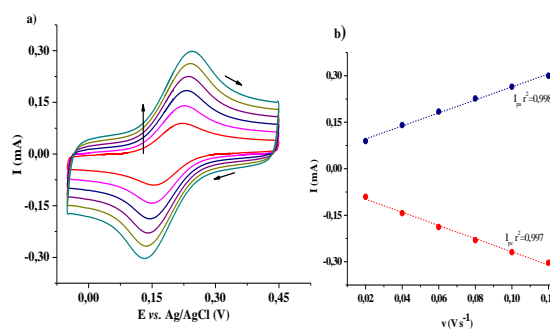
En la Figura 3, se muestra el difractograma de los NTCf y HAp-NTCf, donde se observan ángulos de difracción,  $2\theta$ , de 42 y 26°, característicos de los nanotubos de carbono.

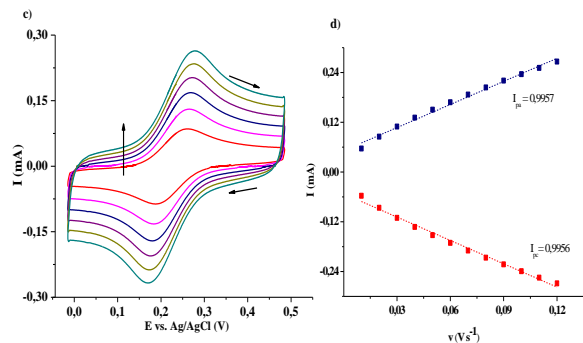


**Figura 3. Difractograma de rayos X del material a) NTCf y b) HAp5-NTCf.**

### Caracterización electroquímica

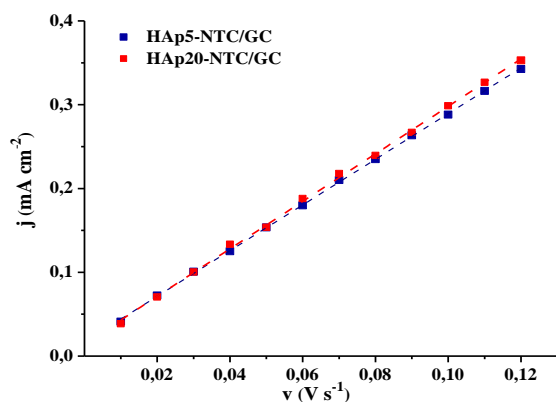
En la Figura 4, se muestra el comportamiento electroquímico de los electrodos HAp5-NTCf/GC y HAp20-NTCf/GC, en una solución de  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ , donde las corrientes y potenciales de pico característicos del par redox, a partir de la cual se construyó las curvas Corriente vs. velocidad de barrido.





**Figura 4. Voltamperogramas cíclicos de los electrodos a) HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC y c) HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC en una solución de 5,0 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>/ K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> en 0,1 M PBS a diferentes velocidades de barrido (ν), 10 -120 mV·s<sup>-1</sup>, b) HAp5-NTC<sub>f</sub>/G y d) HAp20-NTC<sub>f</sub>/G gráfico de I<sub>p</sub> vs. ν.**

Para el cálculo de la capacitancia de los electrodos modificados, se muestra en la Figura 5 la relación entre la densidad de corriente vs. la velocidad de barrido, obtenida a partir de experimentos por VC.



**Figura 5. Relación lineal de la densidad de corrientes vs la velocidad de barrido de los electrodos HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC y HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC en 0,1 mol·L<sup>-1</sup> PBS (pH 7,0).**

En la Figura 6 se muestra el voltamperograma cíclico de los electrodos modificados, donde se puede observar que las corrientes pico características del PB sobre la superficie de los electrodos HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC y HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC, aumentan con el incremento de la velocidad de barrido. Se construyeron curvas corriente vs. velocidad de barrido, las cuales indican que el proceso electroquímico está controlado por adsorción. Además, en esta figura, se muestra la señal de la VC correspondiente al comportamiento de la enzima HRP sobre la superficie de los electrodos modificados HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC y HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC a diferentes velocidades de barrido, a partir de la cual se construyó las curvas corriente vs. velocidad de barrido, las cuales indican igualmente un proceso electroquímico controlado por adsorción.

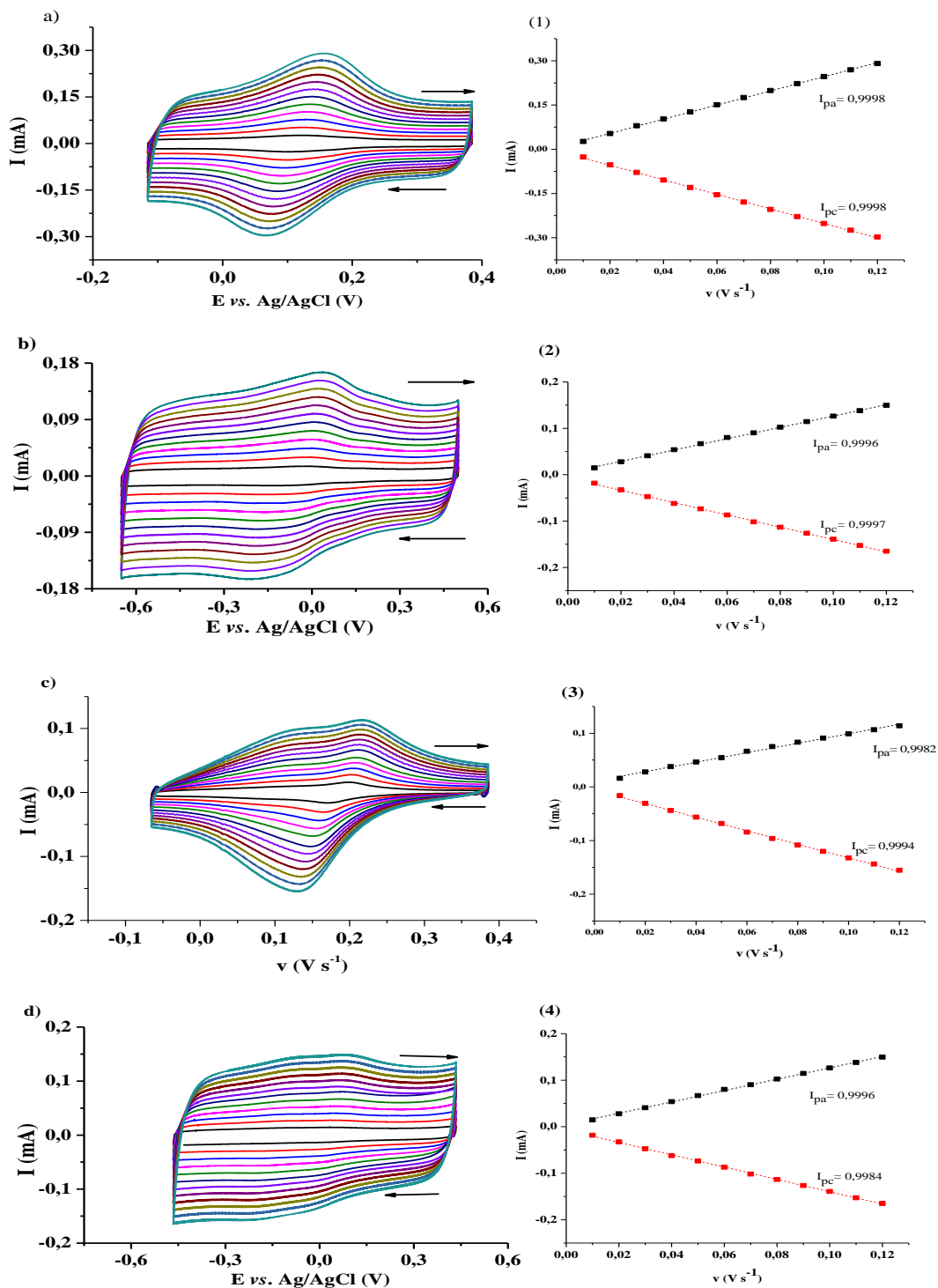


Figura 6. Voltamperogramas cíclicos de los electrodos modificados a) PB/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC, b) HRP/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC, c) PB/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC y d) HRP/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC en 0,1 mol·L<sup>-1</sup> PBS. Velocidades de barrido de 10 a 120 mV s<sup>-1</sup>. Graficas de corrientes pico vs. Velocidad de

barrido, insertos: (1) PB/HAp5-NTCf/GC, (2) HRP/HAp5-NTCf/GC, (3) PB/HAp20-NTCf/GC y (4) HRP/HAp20-NTCf/GC.

En la Tabla 1 se resume el comportamiento del PB sobre los electrodos modificados PB/HAp5-NTCf/GC y PB/HAp20-NTCf/GC y el comportamiento del HRP sobre los electrodos HRP/HAp5-NTCf/GC y HRP/HAp-NTCf/GC, con el aumento de la velocidad de barrido.

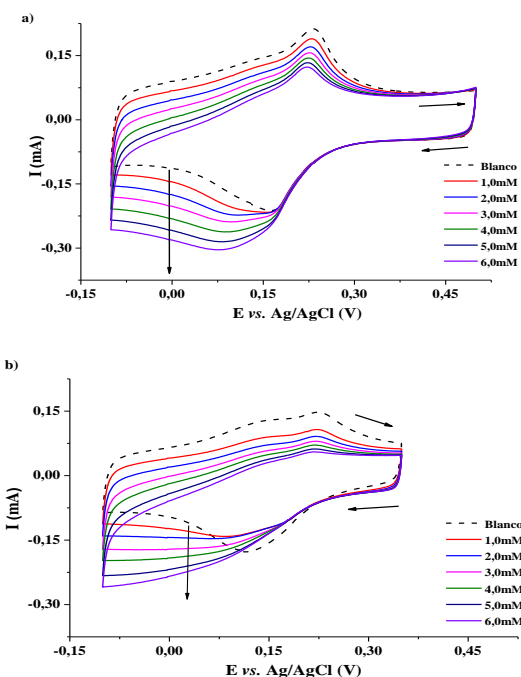
**Tabla1. Parámetros electroquímicos calculados a partir de voltamperogramas de electrodos HAp5- NTCf/GC y HAp20- NTCf/GC modificados con PB y HRP.**

Electrodos	v (mV·s <sup>-1</sup> )	E <sub>pa</sub> (V)	E <sub>pc</sub> (V)	E° (V)	ΔE (mV)	I <sub>pa</sub> /I <sub>pc</sub>
PB/HAp5- NTCf/GC	20	0,103	0,059	0,081	43,14	1,01
	50	0,1	0,053	0,077	46,07	0,98
	80	0,109	0,045	0,077	63,64	0,98
	100	0,115	0,038	0,077	76,68	0,98
	120	0,121	0,032	0,077	88,19	0,98
PB/HAp20-NTCf/GC	20	0,202	0,166	0,184	35,9	0,91
	50	0,21	0,15	0,18	58,91	0,8
	80	0,213	0,142	0,178	70,76	0,77
	100	0,214	0,134	0,174	80,41	0,75
	120	0,215	0,123	0,172	85,01	0,73
HRP/HAp5-NTCf/GC	20	0,032	-0,11	0,039	141,86	1,02
	50	0,032	-0,128	0,048	160,53	1,01
	80	0,049	-0,162	0,056	211,22	1,01
	100	0,061	-0,174	0,056	235,13	1,01
	120	0,073	-0,19	0,059	263,64	1,00
HRP/HAp20-NTCf/GC	20	-0,003	-0,196	0,100	192,93	1,03
	50	-0,003	-0,174	0,088	170,48	1,02
	80	0,020	-0,191	0,086	211,29	1,01
	100	0,025	-0,198	0,087	223,10	1,01
	120	0,030	-0,206	0,088	235,68	1,00

## Reducción electrocatalítica del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Sobre el electrodo PB-HAp5/NTC<sub>f</sub>/GC y PB-HAp20/NTC<sub>f</sub>/GC

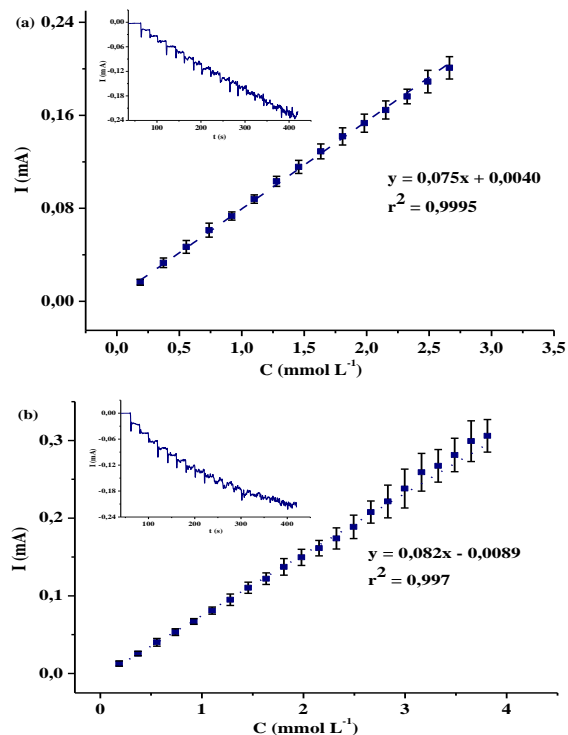
En la Figura 7, se muestran las VCs de la electroreducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a diferentes concentraciones, sobre los electrodos PB/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC y PB/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC.



**Figura 7.** Respuesta voltamperométrica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre: a) PB/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC y b) PB/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC en una solución 0,1 mol·L<sup>-1</sup> de PBS (pH 7,0) con una velocidad de barrido de 50 mV·s<sup>-1</sup>.

En la Figura 8, se muestra el monitoreo de la reducción electrocatalítica mediante cronoamperometría del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre PB/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC y PB/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC

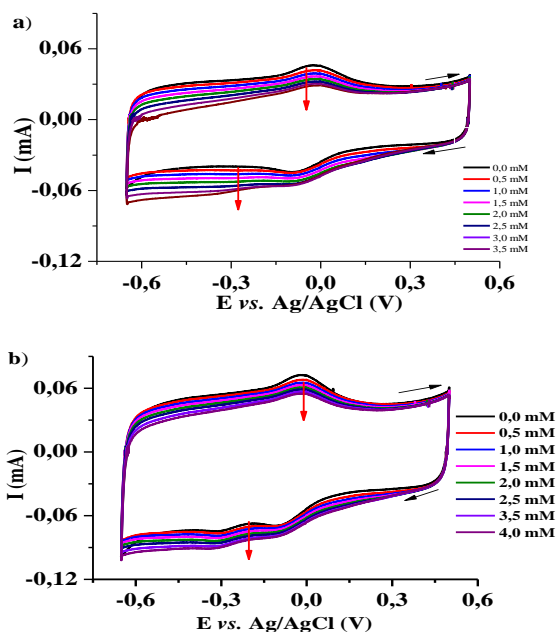
y la curva de calibración correspondiente (insertos).



**Figura 8.** curvas de calibración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un electrodo modificado a) PB/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC y b) PB/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC, mediante cronoamperometría a un potencial de reducción de -0,10 V en solución de 0,1 mol·L<sup>-1</sup> de PBS. Inserto, detección cronoamperométrica,

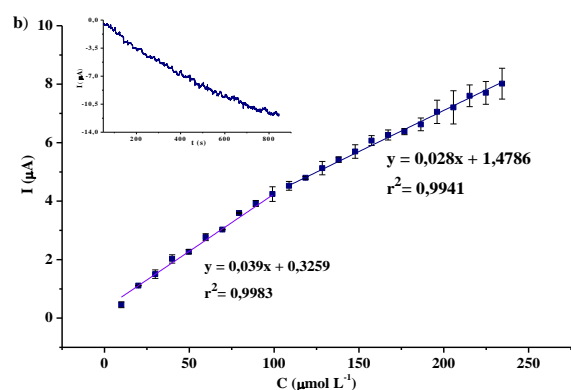
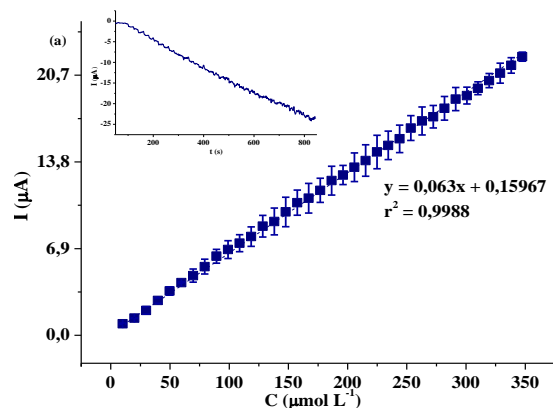
Sobre el electrodo HRP-HAp5/NTC<sub>f</sub>/GC y HRP-HAp20/NTC<sub>f</sub>/GC

En la Figura 9, se muestra las VCs de la electroreducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a diferentes concentraciones, sobre los electrodos HRP/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC y HRP/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC.



**Figura 9.** Respuesta voltamperométrica de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre los electrodos: a) HRP/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC y b) HRP/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC en  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de PBS (pH 7,0) con una velocidad de barrido de  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

En la Figura 10, se muestra el monitoreo de la reducción electrocatalítica del  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediante cronoamperometría sobre HRP/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC y HRP/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC a un potencial de detección de  $-0,20 \text{ V}$  y su respectiva curva de calibración.



**Figura 10.** Curvas de calibración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre: a) HRP/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC y b) HRP/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC, en una solución de  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de PBS. Inserto, detección cronoamperométrica.

### Figuras de mérito

El límite de detección y cuantificación para cada electrodo modificado se presentan en la Tabla 2, la precisión interdía de los electrodos a través de las curvas de calibración en la Tabla 3 y los porcentajes de recuperación en muestras de leche comercial y leche cruda en la Tabla 4.

**Tabla 2.** Parámetros analíticos para  $\text{H}_2\text{O}_2$  por cronoamperometría.

Electrodo modificado	LD	LC
	$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	
PB/HAp5-NTC <sub>f</sub> /GC	26,8	90,8
PB/HAp20-NTC <sub>f</sub> /GC	134,0	446,8
HRP/HAp5-NTC <sub>f</sub> /GC	1,9	6,4
HRP/HAp20-NTC <sub>f</sub> /GC	4,4	14,8

**Tabla 3.** Parámetros de precisión interdía obtenidos mediante regresión (de mínimos cuadrados ordinarios) de las curvas de calibración por cronoamperometría usando diferentes modificaciones para cada día (n = 3).

Electrodos modificados	Pendiente ( $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$ )	RSD (%) n = 3	Intercepto ( $\mu\text{A}$ )	Rango Lineal (mM)
PB/HAp5-NTC <sub>f</sub> /GC	75,21 ± 5,45	7,25	2,43 ± 6,49	0,18–2,66
PB/HAp20-NTC <sub>f</sub> /GC	82,16 ± 6,28	7,65	9,05 ± 0,92	0,18–3,81
HRP/HAp5-NTC <sub>f</sub> /GC	62,09 ± 1,48	2,39	0,26 ± 0,45	0,010–0,347
HRP/HAp20-NTC <sub>f</sub> /GC	31,88 ± 1,65	5,18	0,14 ± 0,72	0,010–0,234

**Tabla 4.** Concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtenidas del biosensor HRP/Hap5-NTC<sub>f</sub>/GC valores de recuperación para el análisis de muestras de leche (n=3).

Muestra	Encontrado $\mu\text{mol L}^{-1}$	Fortificación $\mu\text{mol L}^{-1}$	Recuperación $\mu\text{mol L}^{-1}$	% Recuperación
Leche Comercial	5,56 ± 0,022	100	99,66 ± 1,56	99,66 ± 1,56
		150	147,70 ± 5,98	98,47 ± 3,98

## DISCUSIÓN

### Caracterización de los materiales nanoestructurados

#### Espectros FT-IR

Los espectros IR, Figura 1, para los NTC<sub>f</sub> (Figura 1a) presentan picos pertenecientes a la vibración de los enlaces de los grupos O-H ( $\approx 3500\text{ cm}^{-1}$ ), C=C ( $\approx 1550$  y  $1200\text{ cm}^{-1}$ ), C-H ( $\approx 2917\text{ cm}^{-1}$ ), C-O ( $\approx 1058\text{ cm}^{-1}$ ). En los espectros de los materiales de Hap-NTC<sub>f</sub>, Figuras 1b (Hap5-NTC<sub>f</sub>) y Figura 1c (Hap20-NTC<sub>f</sub>), se observan picos desde 1650 a 1590

$\text{cm}^{-1}$  propios a las vibraciones de los grupos hidroxilos. Además, de encontrarse los picos característicos de los grupos fosfatos asociados a los modos de vibración  $470\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_2$ ),  $567$ ,  $603\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_4$ ) y en  $1034\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_3$ ) (Bouropoulos, et al., 2010; Knupp, et al., 2019), indicando así la presencia de HAp en la superficie de los NTC<sub>f</sub>, ya que, la composición química de la hidroxiapatita es  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , donde sus principales grupos funcionales son los fosfatos e hidroxilos (Penel, et al., 1998; Rincón-López

et al., 2018). Otro resultado obtenido de los espectros IR, es la presencia de picos característicos de las vibraciones de los grupos funcionales como  $\text{CO}_3^{2-}$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$  (Koutsopoulos, 2002), propios de la composición de la hidroxiapatita. En la Figura 1c, se observa que entre 1000 y 1100  $\text{cm}^{-1}$ , los picos característicos de las vibraciones de los enlaces fosfato ( $\nu_3$ ) se encuentran mejor definidos, lo que sugiere la presencia de nanopartículas de HAp de mayor tamaño sobre la superficie de  $\text{NTC}_f$ .

#### *Micrografías TEM*

Las micrografías TEM de los  $\text{NTC}_f$ , Figura 2a, muestran como característica principal de este material una estructura tubular de diámetro aproximado de  $12 \pm 2$  nm; además, se puede observar que los  $\text{NTC}_f$  forman aglomeraciones entre sí. La micrografía de la Figura 2b, muestra que las partículas de HAp sintetizada tienen un tamaño nanométrico, con una longitud de 45 nm y un diámetro aproximado de 20 nm; también se observa que las nanopartículas se encuentran aglomeradas, lo cual se asocia a la tendencia de las partículas nanométricas hacia la búsqueda de menor energía superficial (Han, et al., 2014).

Las micrografías de las nanopartículas de HAp, envejecidas 5 y 20 días, Figura 2c y 2d, respectivamente, indican que se encuentran

incorporadas en las estructuras de los  $\text{NTC}_f$ , además, de mostrar la existencia de zonas de mayor concentración y homogeneidad de nanopartículas de HAp que ocupan un diámetro y longitud menor a los 10 nm. Según Gopi y colaboradores, 2015, reportan que los  $\text{NTC}_f$ , poseen estabilidad térmica y química que les permite mantener su estructura cilíndrica, además dichas propiedades favorecen que la unión superficial entre los  $\text{NTC}_f$  y HAp sean productos de fuerzas electroestáticas.

#### *Difractogramas*

Los difractogramas obtenidos para los  $\text{NTC}_f$ , Figura 3a, y HAp5- $\text{NTC}_f$ , Figura 3b, muestra picos característico de este material; donde, según Hosoya et al., 2004, a  $2\Theta = \sim 26^\circ$  y  $\sim 42^\circ$  aparecen picos asignados a los planos de difracción de 002 y 100 pertenecientes a la composición química de las capas de grafeno de los  $\text{NTC}_f$ , (Rincón-López et al., 2018). El difractograma perteneciente al composito Hap20- $\text{NTC}_f$  presentó señales similares al difractograma del material HAp5- $\text{NTC}_f$  (resultado no mostrado). Por otro lado, tampoco se obtuvo una diferencia significativa entre el difractograma de los  $\text{NTC}_f$ , y el perteneciente al composito Hap5- $\text{NTC}_f$ , resultado que se puede atribuir al reducido tamaño de las nanopartículas de HAp (10 nm); por lo que se puede afirmar que

los  $\text{NTC}_f$  se encuentran en mayor cantidad a las nanopartículas de Hap5, dificultando así la obtención de la difracción de rayos x del composito Hap5- $\text{NTC}_f$ .

### *Caracterización electroquímica*

#### *Electrodos HAp5- $\text{NTC}_f/\text{GC}$ y HAp20- $\text{NTC}_f/\text{GC}$*

En la Figura 4 se observan que los picos pertenecientes a la oxidación y reducción del compuesto  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$  se encuentran bien definidos, donde las corrientes aumentan conforme aumenta la velocidad de barrido.

Luego de la linealización de las corrientes pico vs. velocidad barrido, para el caso del HAp5- $\text{NTC}_f/\text{GC}$  (Figura 4a), con el fin de conocer el mecanismo de transferencia de electrones que gobierna a cada una de las modificaciones, se obtuvo un  $r^2$  de la corriente anódica y catódica de 0,998 y 0,997, respectivamente. De la misma forma para el HAp20- $\text{NTC}_f/\text{GC}$  (Figura 4b) se obtuvo un  $r^2$  para la corriente anódica de 0,9957 y catódica 0,9956. Para ambos casos el comportamiento de las curvas indica que ambos sistemas se encuentran controlados por adsorción.

Aplicando la Ec. 1 se obtuvo un área electroactiva de 0,27 y 0,23  $\text{cm}^2$  para el electrodo HAp5- $\text{NTC}_f/\text{GC}$  y HAp20- $\text{NTC}_f/\text{GC}$ , respectivamente. Estos valores indican que el área de los electrodos

modificados es mayor respecto al electrodo desnudo, cuya área es 0,047  $\text{cm}^2$ . Siendo, el área del HAp5- $\text{NTC}_f/\text{GC}$  mayor a HAp20- $\text{NTC}_f/\text{GC}$ , siendo las nanopartículas de HAp envejecidas 5 días más pequeñas. Además de sugerir que una gran área superficial podría mejorar la inmovilización de la enzima HRP. El estudio de la capacitancia se realizó en un rango de potencial donde no exista corriente faradaica (Akinoglu et al., 2018; Aoki, 2016). La curva de la densidad de corriente vs. la velocidad de barrido, de cuya pendiente se obtuvo la capacitancia de doble capa, se muestra en la Figura 5. Los valores obtenidos fueron 2,85 y 2,72  $\text{mF cm}^{-2}$  para los electrodos HAp5- $\text{NTC}_f/\text{GC}$  y HAp20- $\text{NTC}_f/\text{GC}$ , respectivamente.

#### *Electrodos PB/HAp5- $\text{NTC}_f/\text{GC}$ y PB/HAp20- $\text{NTC}_f/\text{GC}$*

Las señales corriente – potencial obtenidas para estos electrodos corresponden a la reacción de reducción del PB a PW (Prussian White, forma reducida del PB) y a la oxidación del PW a PB según Itaya, et al., (1986).

Sobre el electrodo PB/HAp5- $\text{NTC}_f$  (Figura 6a) se encontró una dependencia lineal entre la corriente y la velocidad de barrido con un  $r^2$  para la corriente anódica de 0,9996 y catódica de 0,9993 y para el electrodo

PB/HAp20-NTC<sub>f</sub> (Figura 6c) se tiene un  $r^2$  para la corriente anódica de 0,9993 y catódica de 0,9990. Por lo que, en ambos electrodos el proceso electroquímico está controlado por adsorción.

También se ha observado en ambas modificaciones, Tabla 1, un mínimo aumento del  $\Delta E_p$  con el aumento de la velocidad de barrido, indicando la ausencia de modificaciones superficiales sobre el electrodo y presencia de oxígeno en el medio electrolítico. Además, se puede observar la relación entre corrientes pico anódica y catódica es aproximadamente 1 ( $I_{pa}/I_{pc} = 0,99$ ) para el electrodo PB/HAp5-NTC<sub>f</sub> lo que indica que la transferencia de electrones ocurre sin procesos cinéticos acoplados, mientras que sobre el electrodo PB/HAp20-NTC<sub>f</sub> el proceso tiene una relación entre corrientes pico anódica y catódica menor a la primera modificación ( $I_{pa}/I_{pc} = 0,80$ ) que disminuye conforme se aumenta la velocidad, además, de observarse una señal (hombro) junto al pico de reducción del PB, lo que nos indica que existe una reacción acoplada afectando el  $\Delta E_p$  y por ende la reversibilidad para la modificación sobre el electrodo PB/HAp20-NTC<sub>f</sub> es menor que sobre el electrodo PB/HAp5-NTC<sub>f</sub>.

La película de PB tiene una concentración de superficie (Ec. 3),  $\Gamma_c$ , de  $8,35 \times 10^{-9}$  y  $8,37 \times 10^{-$

$9 \text{ mol} \cdot \text{cm}^2$  para PB/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC y PB/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC, respectivamente. La concentración superficial de PB obtenida en los electrodos modificados son similares entre sí en magnitud y a las reportadas en la literatura (Cretu, et al., 2006), PBNps/GC (Razmi & Heidari, 2009; Cinti et al., 2014), lo que sugiere que la concentración de PB en la superficie electródica es dependiente al tiempo de inmersión del electrodo en la solución para formar la película de PB.

*Electrodos HRP/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC y HRP/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC*

En el electrodo HRP/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC (Figura 6b) se observan picos bien definidos pertenecientes a la HRP, donde la separación de los potenciales pico anódicos y catódicos  $\Delta E_p$  fue amplia ( $\approx 200 \text{ mV}$  a una velocidad de barrido menor a  $120 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ ), lo que sugiere una mayor resistencia producida por las capas de HRP.

Como se puede observar en la Tabla 1, las corrientes pico anódicas y catódicas son proporcionales al aumento de las velocidades de barrido lo que sugiere en proceso electroquímico controlado por adsorción y la relación entre corrientes pico anódica catódica fue  $\approx 1$  ( $I_{pa}/I_{pc} = 1,02$ ) y se mantuvo constante en función a la velocidad de barrido.

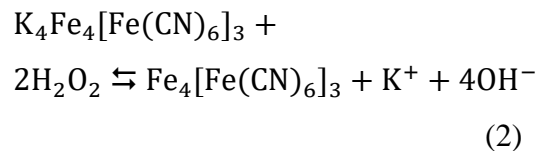
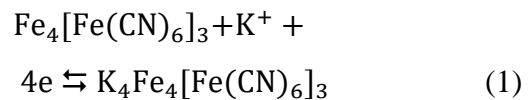
Mientras que el electrodo HRP/HAp20-NTC<sub>f</sub>, (Figura 6d) muestra la señal corriente–potencial del HRP a diferentes velocidades de barrido, donde los picos de corriente anódica y catódica son directamente proporcionales a la velocidad de barrido con un coeficiente de relación de 0,9996 y 0,9984 para la corriente anódica y catódica, respectivamente, lo que sugiere un proceso electroquímico controlado por la superficie del electrodo modificado. Además, se puede observar la relación entre corrientes pico anódica y catódica es aproximada a 1 ( $I_{pa}/I_{pc} = 1,01$ ) para el electrodo HRP/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC que demuestra una buena reversibilidad. La presencia de un pico secundario en reducción con el aumento de la velocidad de barrido indica la presencia de reacciones cinéticas acopladas con transferencia de electrones. Estos resultados muestran que el material HAp5-NTC<sub>f</sub> tiene una superficie biocompatible para la inmovilización de HRP.

### Reducción electrocatalítica del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

*Sobre los electrodos PB/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC y PB/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC*

La Figura 7a, muestra el voltamperograma del electrodo PB/HAp5-NTC<sub>f</sub> en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se observa que, al aumentar la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la corriente del pico catódico aumenta, mientras que la corriente

anódica disminuye, lo cual está indicando la reducción electrocatalítica de este analito sobre este electrodo. Igualmente, el voltamperograma sobre el electrodo PB/HAp20-NTC<sub>f</sub> (Figura 7b) en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indica este mismo resultado. La detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre los electrodos modificados con PB, es posible mediante la electroreducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a potenciales más bajos que sobre el electrodo desnudo (Du, et al., 2010; Salazar, et al., 2011). De acuerdo a la literatura (W. Chen, et al., 2012a; Zhang et al., 2011), la reacción electrocatalítica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de PB superficial se ha expresado como:



La señal cronoamperométrica obtenida a un potencial de trabajo de -0,10 V para los electrodos PB/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC y PB/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC, Figura 8a y 8b, respectivamente, tienen una respuesta rápida de estabilización, lo cual ocurre a un tiempo aproximado a 3s para cada adición consecutiva de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

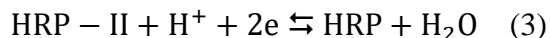
La curva de calibración obtenida sobre el electrodo PB/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC, Figura 8a,

posee un rango dinámico de 0,18 a 2,7 mM con un coeficiente de correlación de 0,9997. El límite de detección obtenido fue de 0,027 mmol·L<sup>-1</sup>, el límite de cuantificación 0,090 mmol·L<sup>-1</sup> y la sensibilidad de 0,0752 mA mmol·L<sup>-1</sup>. Mientras sobre el PB/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC se tiene un rango dinámico de 0,18 a 3,5 mM con un coeficiente de correlación 0,995, sobre el cual se obtuvo un límite de detección de 0,134 mmol·L<sup>-1</sup>, límite de cuantificación de 0,446 mmol·L<sup>-1</sup> y una sensibilidad 0,0701 mA·mmol·L<sup>-1</sup>. Siendo el electrodo PB/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC el que alcanzó los límites de detección y cuantificación más bajos, lo cual se puede asociar a la forma que se aglomeran las nanopartículas de HAp envejecidos 5 días sobre la superficie de los NTC<sub>f</sub>.

#### *Sobre los electrodos HRP/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC y HRP/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC*

Se investigó por VC la respuesta del electrodo HRP/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC en un rango de concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,18 a 3,5 mM (Figura 9a). Un pico anódico está ubicado -0,02 V y uno catódico a 0,086 V, este último aumentó con el aumento de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sobre el electrodo HRP/HAp20-NTC<sub>f</sub> (Figura 9b) se muestra igual resultado. Sobre ambos electrodos, el comportamiento obtenido indica reacción electrocatalítica de

la HRP para la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Siendo el mecanismo de reacción de la enzima HRP con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> el siguiente (Shi,Q., et al., 2008):



En la respuesta cronoamperométrica, a un potencial de trabajo de -0,20 V, sobre el electrodo HRP/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC para detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 10a), se obtuvo un límite de detección de 1,91 μmol·L<sup>-1</sup>, un límite de cuantificación 6,37 μmol·L<sup>-1</sup> y una sensibilidad de 0,0609 μA·μmol<sup>-1</sup>. Sobre el electrodo HRP/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC (Figura 10b), se obtuvo un límite de detección de 4,45 μmol·L<sup>-1</sup>, un límite de cuantificación 14,84 μmol L<sup>-1</sup> y una sensibilidad de 0,0318 μA·μmol<sup>-1</sup> en un rango de 10 a 99 μmol·L<sup>-1</sup> y de 0,0275 μA·μmol<sup>-1</sup> en un rango de 110 a 235 μmol·L<sup>-1</sup>.

Aunque la HRP fue inmovilizada exitosamente en ambos electrodos, se puede observar que sobre el electrodo HRP/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC se tiene una mayor linealidad y rango dinámico, además de un menor límite de detección. Por otro lado, al comparar las sensibilidades de los sistemas modificados se tiene el siguiente orden: HRP/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC > HRP/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC > PB/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC > PB/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC.

La precisión en términos de reproducibilidad de las curvas de calibración se evaluó mediante la repetición interdía. Para el primer caso (PB/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC) se realizaron modificaciones en tres días consecutivos; siguiendo el mismo procedimiento para PB/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC, HRP/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC Y HRP/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC con diferentes modificaciones para cada curva de calibración (n = 3), Tabla 3.

Se calculó la desviación estándar relativa (RSD) de las pendientes de cada curva de calibración, teniendo un promedio de RSD de 7,25% para PB/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC y 7,65% para PB/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC. Para los electrodos modificados con HRP/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC se obtuvo 2,39% y 5,18% para el HRP/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC. Estos resultados muestran que el electrodo con mejor precisión es el HRP/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC.

Para demostrar la aplicabilidad de los biosensores desarrolladas se analizaron muestras de leche comercial, evaluando la

exactitud del método analítico mediante el porcentaje de recuperación en muestras fortificadas con concentraciones conocidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Suarez, et al., 2009). En la Tabla 4, los valores de recuperación obtenidos con el biosensor HRP/Hap5-NTC<sub>f</sub>/GC fue de 104,53% y 98,47% y con una concentración de 5,56 μmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la leche comercial. Demostrando que existen trazas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la leche comercial, ya que se usa el analito durante el proceso de pasteurización de la leche.

La Tabla 5, muestra la comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con resultados similares a los reportados en la literatura por el Grupo de Electroquímica Fundamental y Aplicada de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador; donde hemos logrado sensibilidades similares a los resultados anteriormente reportados en ese grupo de investigación; sin embargo, los límites de detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son más bajos con las modificaciones realizadas en el presente trabajo.

**Tabla 5. Comparación de resultados obtenidos con trabajos previamente reportados en la literatura para la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Electrodo modificado	Sensibilidad μA mM <sup>-1</sup>	Límite de detección (mM)	Potencial de detección (V)	Ref.
----------------------	-------------------------------------	-----------------------------	-------------------------------	------

<b>PB/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC</b>	75,4	0,0268	-0,1	Este trabajo
<b>PB/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC</b>	82,16	0,1340	-0,1	Este trabajo
<b>HRP/HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC</b>	63,96	0,0019	-0,2	Este trabajo
<b>HRP/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC</b>	31,6	0,0044	-0,2	Este trabajo
<b>PB-fCNT/GC</b>	163,01	0,015	0,0	(Guerrero et al., 2019)
<b>HRP-TiO<sub>2</sub>/fCNT/GC</b>	963	0,81	-1,5	(Guerrero et al., 2019)
<b>PB/ZrO<sub>2</sub>-fCNTs/GC</b>	91,3	0,00359	+1,0	(Jerez-Masaquiza, et al., 2020)

### *Cinética de la enzima-sustrato*

La cinética enzima-sustrato, se estudió mediante el cálculo de la constante aparente de Michaelis-Menten,  $K_m$ , (Ec. 4). Se obtuvo un valor de  $K_m$ , de 2,93 mM y 0,37 mM para el HRP inmovilizada sobre la HAp5-NTC<sub>f</sub>/GC y HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC, respectivamente. Aunque, los valores obtenidos de  $K_m$  nos indican que la enzima HRP mantiene su actividad enzimática en ambos electrodos, el mayor valor de  $K_m$  para el electrodo HRP/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC sugiere mayor fuerza de unión del sustrato, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en la matriz enzimática estructurada sobre este electrodo (Li et al., 2013).

### **CONCLUSIÓN**

Según los resultados obtenidos las modificaciones de electrodos de GC con los materiales Hap5-NTC<sub>f</sub> y Hap20-NTC<sub>f</sub> aumentaron el área efectiva y capacitancia respecto al electrodo desnudo.

Con la modificación con PB se obtuvo por VC picos característicos bien definidos y con comportamiento reversible para el electrodo PB/HAp5NTC<sub>f</sub>/GC, sin embargo, para el electrodo PB/HAp20NTC<sub>f</sub>/GC no se obtuvo una buena reversibilidad. Por otro lado, el proceso electrocatalítico sobre el electrodo PB/HAp5NTC<sub>f</sub>/GC, mostró mejor comportamiento para la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, haciendo este electrodo más atractivo que el modificado con HAp envejecida por 20 días (PB/HAp20NTC<sub>f</sub>/GC.)

Se encontró que el electrodo GC modificado con HRP/HAp5-NTC<sub>f</sub> presenta mejores LD, LC y sensibilidad que su par modificado con PB, resultado asociado a una mayor sinergia y biocompatibilidad de la HAp con el HRP, además, se puede decir que el uso de este nanocomposito mejora la inmovilización de la enzima HRP por su menor tamaño de partícula en comparación del electrodo HRP/HAp20-NTC<sub>f</sub>/GC.

El tamaño de partícula de HAp es uno de los factores que más afecta a la comunicación eléctrica, inmovilización y sensibilidad del biosensor electroquímico; por lo cual se recomienda ampliar estos estudios utilizando diferentes tamaños de partículas a los utilizados en este trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a PUCE (Pontificia Universidad Católica del Ecuador) y a la Universidad Yachay Tech por los análisis estructurales y superficiales de los materiales.

## LISTA DE REFERENCIAS

- Ahmad, M., Pan, C., Luo, Z., & Zhu, J. (2010). A single ZnO nanofiber-based highly sensitive amperometric glucose biosensor. *Journal of Physical Chemistry C*, 20 (114), 9308–9313.
- Akinoglu, E. M., Kätelhön, E., Pampel, J., Ban, Z., Antonietti, M., Compton, R. G., & Giersig, M. (2018). Nanoscopic carbon electrodes: Structure, electrical properties and application for electrochemistry. *Carbon*, (130), 768–774.
- Alim, S., Kafi, A. K. M., Rajan, J., & Yusoff, M. M. (2019). Application of polymerized multiporous nanofiber of SnO<sub>2</sub> for designing a bienzyme glucose biosensor based on HRP/GOx. *International Journal of Biological Macromolecules*, (123), 1028–1034.
- Aoki, K. J. (2016). Frequency-dependence of electric double layer capacitance without Faradaic reactions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, (779), 117–125.
- Bai, J., & Zhou, B. (2014). Titanium Dioxide Nanomaterials for Sensor Applications. *Chemical Reviews*, 19 (114), 10131–10176.
- Bouropoulos, N., Stampoulakis, A., & Mouzakis, D. E. (2010). Dynamic mechanical properties of calcium alginate-hydroxyapatite nanocomposite hydrogels. *Science of Advanced Materials*, 2 (2), 239–242.
- Chen, S., Yuan, R., Chai, Y., & Hu, F. (2013). Electrochemical sensing of hydrogen peroxide using metal nanoparticles: A review. *Microchimica Acta*, 1–2 (180), 15–32.
- Chen, W., Cai, S., Ren, Q. Q., Wen, W., & Zhao, Y. Di. (2012). Recent advances in electrochemical sensing for hydrogen peroxide: A review. *Analyst*, 1 (137), 49–58.
- Cinti, S., Arduini, F., Vellucci, G., Cacciotti, I., Nanni, F., & Moscone, D. (2014). Carbon black assisted tailoring of Prussian Blue nanoparticles to tune sensitivity and detection limit towards

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by using screen-printed electrode. *Electrochemistry Communications*, (47), 63–66.
- Cretu, R. C., Gligor, D. M., Muresan, L., Popescu, I. C., & Muresan, L. M. (2006). Kinetic characterization of Prussian Blue-modified graphite electrodes for amperometric detection of hydrogen peroxide. *Journal of Applied Electrochemistry*, 12 (36), 1327–1332.
- Du, D., Wang, M., Qin, Y., & Lin, Y. (2010). One-step electrochemical deposition of Prussian Blue-multiwalled carbon nanotube nanocomposite thin-film: Preparation, characterization and evaluation for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing. *Journal of Materials Chemistry*, 8 (20), 1532–1537.
- Gonzalez, G., Albano, C., Herman, V., Boyer, I., Monsalve, A., & Brito, J. A. (2011). Nanocomposite building blocks of TiO<sub>2</sub>-MWCNT<sub>f</sub> and ZrO<sub>2</sub>-MWCNT<sub>f</sub>. *Materials characterization*, (64), 96-106.
- Gopi, D., Shinyjoy, E., & Kavitha, L. (2015). Influence of ionic substitution in improving the biological property of carbon nanotubes reinforced hydroxyapatite composite coating on titanium for orthopedic applications. *Ceramics International*, 4 (41), 5454–5463.
- Guerrero, L. A., Fernández, L., González, G., Montero-Jiménez, M., Uribe, R., Díaz Barrios, A., & Espinoza-Montero, P. J. (2019). Peroxide Electrochemical Sensor and Biosensor Based on Nanocomposite of TiO<sub>2</sub> Nanoparticle/ Multi-Walled Carbon Nanotube Modified Glassy Carbon Electrode. *Nanomaterials*, 1 (10), 64.
- Gutiérrez, A., Rodríguez, M. C., Galicia, L., & Rivas, G. A. (2011). Amperometric glucose biosensor. Electrode modified with carbon nanotubes. *ECS Transactions*, 1 (36), 393–400.
- Gutiérrez, A., Rodríguez, M. C., Galicia, L., & Rivas, G. A. (2011). Amperometric Glucose Biosensor Electrode Modified with Carbon Nanotubes. *ECS Transactions*, 1 (36), 393–400.
- Hang, T., Xiao, S., Yang, C., Li, X., Guo, C., He, G., Li, B., Yang, C., Chen, H. jiu, Liu, F., Deng, S., Zhang, Y., & Xie, X. (2019). Hierarchical graphene/nanorods-based H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> electrochemical sensor with self-cleaning and anti-biofouling properties. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, (289), 15–23.
- Hosoya, K., Ohtsuki, C., Kawai, T., Kamitakahara, M., Ogata, S. I., Miyazaki, T., & Tanihara, M. (2004). A novel covalently crosslinked gel of alginate and silane with the ability to form bone-like apatite. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 4 (71), 596–601.
- Itaya, K., Uchida, I., & Neff, V. D. (1986). Electrochemistry of Polynuclear Transition Metal Cyanides: Prussian Blue and Its Analogues. *Accounts of Chemical Research*, 6 (19), 162–168.

- Jerez-Masaquiza, M. D., Fernández, L., González, G., Montero-Jiménez, M., & Espinoza-Montero, P. J. (2020). Electrochemical Sensor Based on Prussian Blue Electrochemically Deposited at ZrO<sub>2</sub> Doped Carbon Nanotubes Glassy Carbon Modified Electrode. *Nanomaterials*, 7 (10), 1328.
- Kišija, E., Osmanović, D., Nuhić, J., & Cifrić, S. (2020). Review of Biosensors in Industrial Process Control. *International Conference on Medical and Biological Engineering*, (pp. 687–694), Springer.
- Knupp, W. G., Ribeiro, M. S., Mir, M., & Camps, I. (2019). Dynamics of hydroxyapatite and carbon nanotubes interaction. *Applied Surface Science*. (495), 143493.
- Komkova, M. A., Andreev, E. A., Ibragimova, O. A., & Karyakin, A. A. (2019). Prussian Blue based flow-through (bio)sensors in power generation mode: New horizons for electrochemical analyzers. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, (292), 284–288.
- Koutsopoulos, S. (2002). Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. *Journal of Biomedical Materials Research*, 4 (62), 600–612.
- Kucherenko, D. Y., Kucherenko, I. S., Soldatkin, O. O., Topolnikova, Y. V., Dzyadevych, S. V., & Soldatkin, A. P. (2019). A highly selective amperometric biosensor array for the simultaneous determination of glutamate, glucose, choline, acetylcholine, lactate and pyruvate. *Bioelectrochemistry*, (128), 100–108.
- Li, Y., Lv, X., Wu, D., Ma, H., Feng, R., Wang, Y., Du, B., & Wei, Q. (2013). Screen Printed Biosensor for Hydrogen Peroxide Based on Prussian Blue Modified Hydroxyapatite. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 4 (23), 917–922.
- Liu, Han, Liu, J., Liu, Y., Bertoldi, K., & Vecitis, C. D. (2014). Quantitative 2D electrooxidative carbon nanotube filter model: Insight into reactive sites. *Carbon*, 1 (80), 651–664.
- Liu, Hui, Guo, K., Duan, C., Dong, X., & Gao, J. (2017). Hollow TiO<sub>2</sub> modified reduced graphene oxide microspheres encapsulating hemoglobin for a mediator-free biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, (87), 473–479.
- Ma, R., Wang, B., Liu, Y., Li, J., Zhao, Q., Wang, G., Jia, W., & Wang, H. (2009). Direct electrochemistry of glucose oxidase on the hydroxyapatite/Nafion composite film modified electrode and its application for glucose biosensing. *Science in China, Series B: Chemistry*, 11 (52), 2013–2019.
- Morimune-Moriya, S., Kondo, S., Sugawara-Narutaki, A., Nishimura, T., Kato, T., & Ohtsuki, C.

- (2015). Hydroxyapatite formation on oxidized cellulose nanofibers in a solution mimicking body fluid. *Polymer Journal*, 2 (47), 158–163.
- Moyo, M., Okonkwo, J. O., & Agyei, N. M. (2013). A novel hydrogen peroxide biosensor based on adsorption of horseradish peroxidase onto a nanobiomaterial composite modified glassy carbon electrode. *Electroanalysis*, 8 (25), 1946–1954.
- Narwal, V., Deswal, R., & Pundir, C. S. (2018). Fabrication of an electrochemical H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensor based on immobilization of hemoglobin nanoparticles onto pencil graphite electrode. *Process Biochemistry*, (71), 61–68.
- Palanisamy, S., Velusamy, V., Chen, S. W., Yang, T. C. K., Balu, S., & Banks, C. E. (2019). Enhanced reversible redox activity of hemin on cellulose microfiber integrated reduced graphene oxide for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensor applications. *Carbohydrate Polymers*, (204), 152–160.
- Penel, G., Leroy, G., Rey, C., & Bres, E. (1998). MicroRaman spectral study of the PO<sub>4</sub> and CO<sub>3</sub> vibrational modes in synthetic and biological apatites. *Calcified Tissue International*, 6 (63), 475–481.
- Rairán, F. S. G., & Casallas, L. H. C. (2018). Avances en electrodos y biosensores elaborados con nanotubos de carbono. *Ingeniería y Desarrollo*, 1 (36), 240–258.
- Raphey, V. R., Henna, T. K., Nivitha, K. P., Mufeedha, P., Sabu, C., & Pramod, K. (2019). Advanced biomedical applications of carbon nanotube. *Materials Science and Engineering C*, (100), 616–630.
- Razmi, H., & Heidari, H. (2009). Self-Assembled Prussian Blue Nanoparticles Based Electrochemical Sensor for High Sensitive Determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Acidic Media. *Electroanalysis*, 21 (21), 2355–2362.
- Reddy Channu, V. S., Kalluru, R. R., Schlesinger, M., Mehring, M., & Holze, R. (2011). Synthesis and characterization of ZrO<sub>2</sub> nanoparticles for optical and electrochemical applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1–3 (386), 151–157.
- Rincón-López, J. A., Hermann-Muñoz, J. A., Giraldo-Betancur, A. L., Vizcaya-Ruiz, D., Alvarado-Orozco, J. M., & Muñoz-Saldaña, J. (2018). Synthesis, characterization and in vitro study of synthetic and Bovine-Derived hydroxyapatite ceramics: A Comparison. *Materials*, 333 (11), 17.
- Ronkainen, N. J., Halsall, H. B., & Heineman, W. R. (2010). Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 5 (39), 1747–1763.

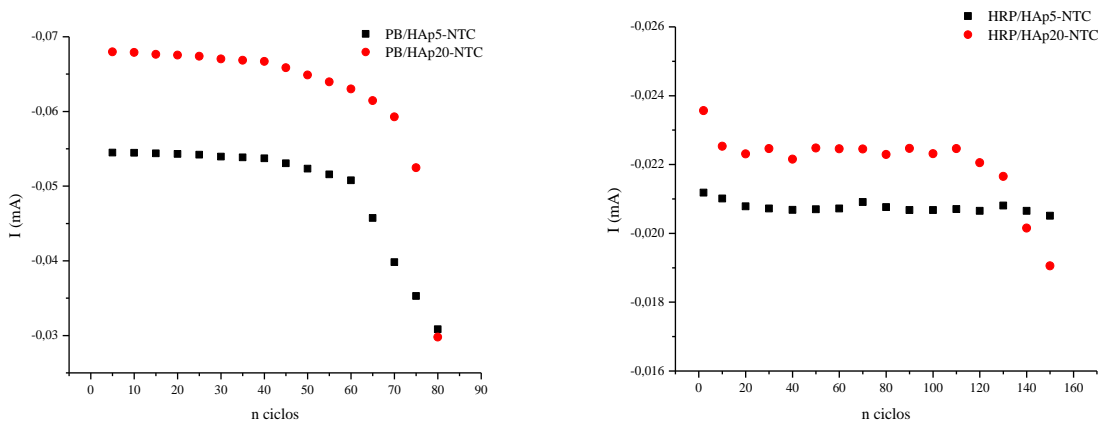
- Roointan, A., Ahmad Mir, T., Ibrahim Wani, S., Mati-ur-Rehman, Hussain, K. K., Ahmed, B., Abraham, S., Savardashtaki, A., Gandomani, G., Gandomani, M., Chinnappan, R., & Akhtar, M. H. (2019). Early detection of lung cancer biomarkers through biosensor technology: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (164), 93–103.
- Salazar, P., O'Neill, R. D., Martín, M., Roche, R., & González-Mora, J. L. (2011). Amperometric glucose microbiosensor based on a Prussian Blue modified carbon fiber electrode for physiological applications. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 2 (152), 137–143.
- Shi, A. W., Qu, F. L., Yang, M. H., Shen, G. L., & Yu, R. Q. (2008). Amperometric H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensor based on poly-thionine nanowire/HRP/nano-Au-modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 2 (129), 779–783.
- Sianipar, M., Kim, S. H., Iskandar, F., & Wenten, I. G. (2017). Functionalized carbon nanotube (CNT) membrane: Progress and challenges. *RSC Advances*, 81 (7), 51175–51198.
- Suarez, R., Arévalo, E., Linares, L., & Ustáriz, F. (2009). Validación de un método analítico para la determinación de magnesio eritrocitario. *Avances En Química*, 4(2), 53–62.
- Thirumalraj, B., Rajkumar, C., Chen, S. M., & Barathi, P. (2016). Highly stable biomolecule supported by gold nanoparticles/graphene nanocomposite as a sensing platform for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensor application. *Journal of Materials Chemistry B*, 38 (4), 6335–6343.
- Thirumalraj, B., Sakthivel, R., Chen, S. M., Rajkumar, C., Yu, L., & Kubendhiran, S. (2019). A reliable electrochemical sensor for determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in biological samples using platinum nanoparticles supported graphite/ gelatin hydrogel. *Microchemical Journal*, (146), 673–678.
- Tsiafoulis, C. G., Trikalitis, P. N., & Prodromidis, M. I. (2005). Synthesis, characterization and performance of vanadium hexacyanoferrate as electrocatalyst of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Electrochemistry Communications*, 12 (7), 1398–1404.
- Wang, B., Zhang, J. J., Pan, Z. Y., Tao, X. Q., & Wang, H. S. (2009). A novel hydrogen peroxide sensor based on the direct electron transfer of horseradish peroxidase immobilized on silica-hydroxyapatite hybrid film. *Biosensors and Bioelectronics*, 5 (24), 1141–1145.
- Wang, J., Wang, Y., Cui, M., Xu, S., & Luo, X. (2017). Enzymeless voltammetric hydrogen peroxide sensor based on the use of PEDOT doped with Prussian Blue nanoparticles. *Microchimica Acta*, 2 (184), 483–489.
- Xu, S., Qin, X., Zhang, X., & Zhang, C. (2015). A third-generation biosensor for hydrogen

- peroxide based on the immobilization of horseradish peroxidase on a disposable carbon nanotubes modified screen-printed electrode. *Microchimica Acta*, 7–8 (182), 1241–1246.
- Yang, M., Yang, Y., Yang, Y., Shen, G., & Yu, R. (2004). Bionzymatic amperometric biosensor for choline based on mediator thionine in situ electropolymerized within a carbon paste electrode. *Analytical Biochemistry*, 1 (334), 127–134.
- Yuan, J., Xu, S., Zeng, H. Y., Cao, X., Dan Pan, A., Xiao, G. F., & Ding, P. X. (2018). Hydrogen peroxide biosensor based on chitosan/2D layered double hydroxide composite for the determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Bioelectrochemistry*, (123), 94–102.
- Zhang, M., Yuan, R., Chai, Y., Li, W., Zhong, H., & Wang, C. (2011). Glucose biosensor based on titanium dioxide-multiwall carbon nanotubes-chitosan composite and functionalized gold nanoparticles. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 9 (34), 1143–1150.

## APENDICE

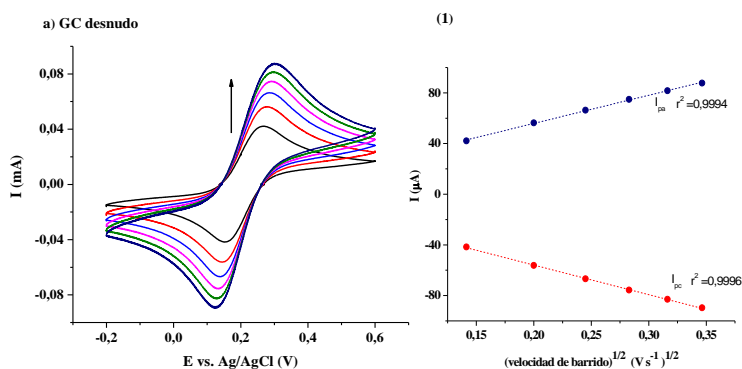
### Estabilidad de los electrodos modificados

Cada electrodo modificado fue sometido a 16 ciclos voltamperométricos en  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0), para evaluar su estabilidad en el medio electrolítico (Figura S11)



**Figura S11. Estabilidad electroquímica en PBS a una velocidad de barrido de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , a) PB/HAp5-NTC/GC y PB/HAp20-NTC/GC y b) HRP/HAp5-NTC/GC y HRP/HAp20-NTC/GC.**

En la Figura S12 se muestra la caracterización electroquímica del a) electrodo desnudo en presencia de  $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  en  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  PBS a velocidades de barrido de 20, 40, 60, 80, 100 y  $120 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Figura S12. Voltamperogramas cíclicos del electrodo de a) GC desnudo en  $5,0 \text{ mM} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$   $0,1 \text{ M}$  de la PBS (pH 7,0) a diferentes velocidades de barrido y (1) su**

respectiva regresión lineal de corrientes pico anódicas (línea azul) y catódicas (línea roja) vs.  $v^{1/2}$ .

En la Tabla S1 se presenta los parámetros electroquímicos calculados desde voltamperogramas de PB y HRP en electrodos modificados con HAp5-NTC<sub>f</sub> y HAp20-NTC<sub>f</sub>

**TABLA S1. Parámetros electroquímicos calculados a partir de voltamperogramas de electrodos modificados en 0,1M PBS (7,0) a diferentes velocidades de barrido.**

Electrodo	$v$ (mV s <sup>-1</sup> )	$E_{pa}$ (V)	$I_{pa}$ (mA)	$E_{pc}$ (V)	$I_{pc}$ (mA)	$I_{pa} / I_{pc}$	$E^{\circ}$ (V)	$\Delta E$ (V)
PB/HAp5- NTC <sub>f</sub>	10	0,086	0,026	0,069	-0,027	0,99	0,078	0,017
	20	0,103	0,053	0,059	-0,053	1,01	0,081	0,043
	30	0,091	0,079	0,060	-0,078	1,01	0,076	0,031
	40	0,097	0,102	0,058	-0,105	0,98	0,078	0,040
	50	0,100	0,126	0,054	-0,129	0,97	0,077	0,046
	60	0,102	0,151	0,052	-0,154	0,98	0,077	0,050
	70	0,104	0,175	0,048	-0,179	0,98	0,077	0,056
	80	0,109	0,199	0,045	-0,204	0,97	0,077	0,063
	90	0,112	0,223	0,042	-0,228	0,97	0,077	0,070
	100	0,115	0,246	0,039	-0,252	0,98	0,077	0,077
	110	0,117	0,269	0,034	-0,275	0,98	0,076	0,083
	120	0,121	0,290	0,033	-0,297	0,98	0,077	0,088
PB/HAp20- NTC <sub>f</sub>	10	0,198	0,016	0,172	-0,016	0,99	0,186	0,026
	20	0,202	0,027	0,166	-0,031	0,91	0,184	0,036
	30	0,204	0,037	0,159	-0,044	0,86	0,182	0,045
	40	0,206	0,046	0,156	-0,056	0,82	0,181	0,050
	50	0,209	0,054	0,150	-0,068	0,80	0,179	0,059
	60	0,212	0,066	0,148	-0,084	0,78	0,179	0,064
	70	0,213	0,075	0,142	-0,096	0,78	0,177	0,071
	80	0,213	0,083	0,142	-0,108	0,77	0,177	0,071
	90	0,215	0,091	0,138	-0,120	0,76	0,177	0,077
	100	0,214	0,099	0,134	-0,132	0,75	0,174	0,080
	110	0,217	0,107	0,134	-0,144	0,74	0,175	0,083
	120	0,215	0,114	0,123	-0,155	0,73	0,172	0,085
HRP/HAp5- NTC <sub>f</sub>	10	0,005	0,016	-0,109	-0,015	1,03	0,052	0,114
	20	0,032	0,030	-0,109	-0,029	1,02	0,039	0,141
	30	0,033	0,045	-0,161	-0,043	1,02	0,064	0,193
	40	0,032	0,058	-0,127	-0,058	1,01	0,047	0,159
	50	0,032	0,072	-0,128	-0,071	1,01	0,048	0,160
	60	0,035	0,086	-0,149	-0,085	1,01	0,057	0,184
	70	0,049	0,099	-0,163	-0,099	1,01	0,057	0,212

	80	0,049	0,113	-0,162	-0,112	1,01	0,056	0,211
	90	0,056	0,126	-0,161	-0,126	1,01	0,053	0,217
	100	0,061	0,140	-0,174	-0,139	1,01	0,056	0,235
	110	0,063	0,153	-0,181	-0,153	1,00	0,059	0,244
	120	0,073	0,167	-0,190	-0,166	1,00	0,059	0,263
HRP/HAp20- NTC <sub>f</sub>	10	-0,031	0,016	-0,196	-0,015	1,05	-0,113	0,165
	20	-0,003	0,030	-0,196	-0,029	1,03	-0,100	0,193
	30	0,003	0,045	-0,197	-0,043	1,03	-0,097	0,199
	40	-0,003	0,059	-0,189	-0,058	1,01	-0,096	0,185
	50	-0,003	0,072	-0,174	-0,071	1,02	-0,088	0,170
	60	0,000286	0,086	-0,155	-0,085	1,02	-0,077	0,154
	70	0,015	0,100	-0,199	-0,099	1,01	-0,092	0,214
	80	0,020	0,113	-0,191	-0,112	1,01	-0,086	0,211
	90	0,023	0,126	-0,197	-0,125	1,01	-0,087	0,220
	100	0,025	0,139	-0,198	-0,138	1,01	-0,087	0,223
	110	0,028	0,152	-0,210	-0,152	1,01	-0,091	0,237
	120	0,030	0,165	-0,206	-0,165	1,00	-0,088	0,236

## ANÁLISIS DE REGRESIÓN

**TABLA S2. Análisis de regresión de las curvas de calibración pertenecientes al electrodo modificado PB/HAp5-NTC<sub>f</sub>**

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
<b>Coefficiente de correlación múltiple</b>	0,99983
<b>Coefficiente de determinación R<sup>2</sup></b>	0,99966
<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	0,99963
<b>Error típico</b>	0,00105
<b>Observaciones</b>	14

## ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
<b>Regresión</b>	1	0,03902	0,039025	35703,959	3,2455E-22

<b>Residuos</b>	12	1,3116E-05	1,093E-06			
<b>Total</b>	13	0,03904				
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
<b>Intercepción</b>	0,003080	0,000665	4,6305	0,000579	0,001631	0,004530
<b>Variable X 1</b>	0,074376	0,000393	188,9549	3,245E-22	0,0735189	0,075234

### ANÁLISIS DE LOS RESIDUALES

<i>Observación</i>	<i>Pronóstico para Y</i>	<i>Residuos</i>	<i>(Residuos/pronóstico)*100</i>
<b>1</b>	0,0308	-0,0006	-2,0297
<b>2</b>	0,0445	-0,0006	-1,4590
<b>3</b>	0,0580	7,4866E-05	0,1289
<b>4</b>	0,0715	0,0010	1,4552
<b>5</b>	0,0849	-0,0005	-0,5943
<b>6</b>	0,0982	0,0015	1,5763
<b>7</b>	0,1113	0,0003	0,2304
<b>8</b>	0,1245	-0,0004	-0,3471
<b>9</b>	0,1375	3,8739E-05	0,0282
<b>10</b>	0,1504	0,0011	0,7187
<b>11</b>	0,1632	-0,0009	-0,5206
<b>12</b>	0,1759	-0,0023	-1,3183
<b>13</b>	0,1883	0,0004	0,2125
<b>14</b>	0,2011	0,0009	0,4668

**TABLA S3. Análisis de regresión de las curvas de calibración pertenecientes al electrodo modificado PB/HAp20-NTC<sub>f</sub>**

*Estadísticas de la regresión*

<b>Coefficiente de correlación múltiple</b>	0,99783
<b>Coefficiente de determinación R^2</b>	0,99566
<b>R^2 ajustado</b>	0,99533
<b>Error típico</b>	0,00357
<b>Observaciones</b>	15

### ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>	
<b>Regresión</b>	1	0,037955	0,037955	2985,5016	9,5103E-17	
<b>Residuos</b>	13	0,000165	1,2713E-05			
<b>Total</b>	14	0,038120				
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
<b>Intercepción</b>	0,025022	0,002594	9,646784	2,7264E-07	0,019419	0,030626
<b>Variable X 1</b>	0,067288	0,001231	54,639744	9,5103E-17	0,064627	0,069948

### ANÁLISIS DE LOS RESIDUALES

<i>Observación</i>	<i>Pronóstico para Y</i>	<i>Residuos</i>	<i>(Residuos/pronóstico)*100</i>
<b>1</b>	0,075	-0,005	-6,933
<b>2</b>	0,087	-0,004	-4,339
<b>3</b>	0,099	0,001	1,216
<b>4</b>	0,111	0,002	2,211
<b>5</b>	0,123	0,005	4,209
<b>6</b>	0,135	0,004	2,806
<b>7</b>	0,147	0,002	1,316
<b>8</b>	0,158	-0,002	-1,547

9	0,170	-0,004	-2,271
10	0,181	0,000	0,171
11	0,193	0,003	1,408
12	0,204	0,002	0,911
13	0,215	0,003	1,568
14	0,227	-0,004	-1,770
15	0,238	-0,004	-1,489

**TABLA S4. Análisis de regresión de las curvas de calibración pertenecientes al electrodo modificado HRP/HAp5-NTC<sub>f</sub>**

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
<b>Coefficiente de correlación múltiple</b>	0,999825
<b>Coefficiente de determinación R<sup>2</sup></b>	0,999651
<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	0,999640
<b>Error típico</b>	0,110353
<b>Observaciones</b>	33

**ANALISIS DE VARIANZA**

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>	
<b>Regresión</b>	1	1083,3715	1083,3716	88962,916	3,5797E-55	
<b>Residuos</b>	31	0,37751	0,0121778			
<b>Total</b>	32	1083,749				
	<i>Coefficiente s</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
<b>Intercepción</b>	0,246079	0,0396565	6,2052745	6,8513E-07	0,165199	0,326959

<b>Variable X</b>	0,062225	0,0002086	298,26651	3,5797E-55	0,061799	0,06265
<b>1</b>						<b>1</b>

### ANÁLISIS DE LOS RESIDUALES

<i>Observación</i>	<i>Pronóstico para Y</i>	<i>Residuos</i>	<i>(Residuos/pronóstico)*100</i>
<b>1</b>	0,868	0,007	0,771
<b>2</b>	1,488	-0,079	-5,311
<b>3</b>	2,107	-0,209	-9,908
<b>4</b>	2,725	-0,024	-0,868
<b>5</b>	3,342	-0,005	-0,149
<b>6</b>	3,957	0,096	2,434
<b>7</b>	4,571	-0,028	-0,619
<b>8</b>	5,184	-0,012	-0,245
<b>9</b>	5,796	0,158	2,728
<b>10</b>	6,407	0,046	0,713
<b>11</b>	7,016	0,097	1,378
<b>12</b>	7,624	0,017	0,226
<b>13</b>	8,232	0,006	0,069
<b>14</b>	8,837	0,025	0,275
<b>15</b>	9,442	-0,005	-0,053
<b>16</b>	10,045	0,156	1,550
<b>17</b>	10,647	-0,067	-0,628
<b>18</b>	11,248	0,017	0,151
<b>19</b>	11,848	0,191	1,613
<b>20</b>	12,447	0,035	0,281
<b>21</b>	13,044	0,049	0,373
<b>22</b>	13,641	-0,027	-0,200
<b>23</b>	14,236	-0,099	-0,702

24	14,830	-0,136	-0,914
25	15,423	-0,212	-1,373
26	16,015	0,036	0,224
27	16,605	-0,095	-0,573
28	17,195	-0,176	-1,024
29	17,783	-0,188	-1,057
30	18,369	0,158	0,859
31	18,956	0,022	0,114
32	19,541	0,085	0,435
33	20,124	0,165	0,818

**TABLA S5. Análisis de regresión de las curvas de calibración pertenecientes al electrodo modificado HRP/HAp20-NTC<sub>r</sub>**

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
<b>Coefficiente de correlación múltiple</b>	0,9961
<b>Coefficiente de determinación R<sup>2</sup></b>	0,9922
<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	0,9917
<b>Error típico</b>	0,1563
<b>Observaciones</b>	19

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
<b>Regresión</b>	1	52,5944	52,5944	2153,3838	2,3995E-19
<b>Residuos</b>	17	0,4152	0,0244		
<b>Total</b>	18	53,0096			

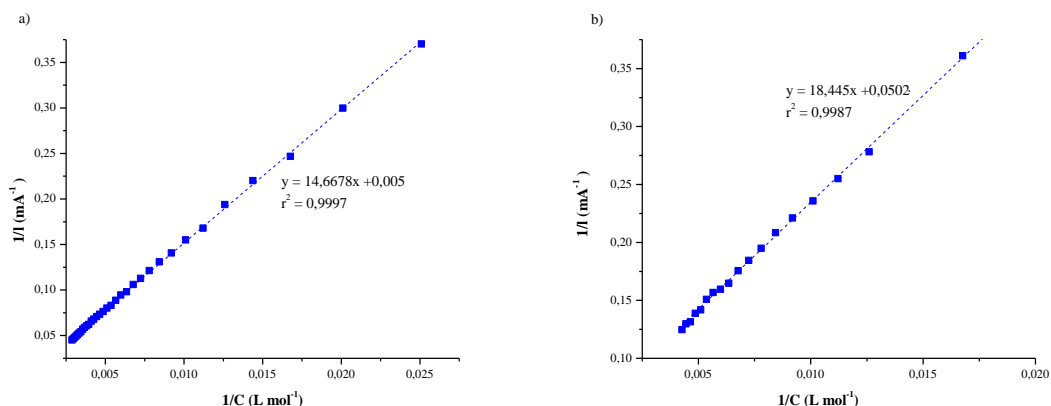
  

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
--	----------------------	---------------------	----------------------	---------------------	---------------------	---------------------

<b>Intercepción</b>	0,989289	0,093178	10,617180	6,3911E-09	0,79270	1,18587
<b>Variable X 1</b>	0,031169	0,000672	46,404566	2,3995E-19	0,02975	0,03258

### ANÁLISIS DE LOS RESIDUALES

<i>Observación</i>	<i>Pronóstico para Y</i>	<i>Residuos</i>	<i>(Residuos/pronóstico)*100</i>
<b>1</b>	2,231	-0,208	-9,303
<b>2</b>	2,540	-0,270	-10,613
<b>3</b>	2,848	-0,078	-2,750
<b>4</b>	3,156	-0,131	-4,150
<b>5</b>	3,463	0,131	3,790
<b>6</b>	3,769	0,152	4,027
<b>7</b>	4,075	0,167	4,089
<b>8</b>	4,381	0,144	3,290
<b>9</b>	4,685	0,111	2,379
<b>10</b>	4,989	0,141	2,817
<b>11</b>	5,293	0,128	2,424
<b>12</b>	5,596	0,103	1,833
<b>13</b>	5,898	0,174	2,954
<b>14</b>	6,199	0,065	1,050
<b>15</b>	6,501	-0,121	-1,859
<b>16</b>	6,801	-0,174	-2,563
<b>17</b>	7,101	-0,046	-0,643
<b>18</b>	7,400	-0,194	-2,618
<b>19</b>	7,699	-0,095	-1,233



**FIGURA S12.** Curva de  $1/I_c$  vs  $1/C$  para el cálculo de la constante aparente de Michaelis-Menten desde la ecuación de Lineweaver-Burk

**TABLA S6.** Cálculo de  $K_m^{app}$  desde la ecuación de Lineweaver-Burk y la Figura S12.

	HRP/HAp5-NTCf/GC	HRP/HAp20-NTCf/GC	Unidades
<b><math>K_m/I_{max}</math></b>	14,6678	18,445	mM/mA
<b><math>1/I_{max}</math></b>	0,00504	0,0502	1/mA
<b><math>I_{max}</math></b>	200	19,9203	mA
<b><math>K_m</math></b>	<b>2,93356</b>	<b>0,3674302</b>	<b>mM</b>

**Tabla S7.** Curva de  $H_2O_2$  obtenidas del biosensor HRP/Hap5-NTCf/GC sin fortificación en muestras de leche comercial.

<b>C (<math>\mu</math>M)</b>	<b>I (<math>\mu</math>A)</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>Covarianza</b>
25	2,1901	0,0253	1,1530
50	4,5312	0,1010	2,2291
75	5,8688	0,0195	0,3316
100	7,9542	0,0210	0,2646
125	10,0455	0,0105	0,1049
150	11,6702	0,0615	0,5271
175	13,6284	0,1359	0,9975

200	15,2369	0,1174	0,7705
225	17,2389	0,0483	0,2804
250	18,7567	0,0713	0,3800
275	20,6339	0,1406	0,6813
300	22,2111	0,0307	0,1383

**Tabla S8.** Recuperación de curvas de calibración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtenidas del biosensor HRP/Hap5-NTCf/GC sin fortificación.

<b>m</b>	<b>0,073</b>	<b>0,00073</b>
<b>b</b>	0,694	0,134
<b>Cm+ 4μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	9,559	0,218
<b>C muestra</b>	5,559	

**Tabla S9.** Resumen Curvas de calibración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtenidas del biosensor HRP/Hap5-NTCf/GC sin fortificación en muestras de leche comercial.

<b>Estadísticas de la regresión</b>	
<b>Coefficiente de correlación múltiple</b>	0,9995
<b>Coefficiente de determinación R<sup>2</sup></b>	0,9989
<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	0,9989
<b>Error típico</b>	0,2181
<b>Observaciones</b>	12

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
<b>Regresión</b>	1	471,5019	471,5019	9914,7150	2,5568E-16
<b>Residuos</b>	10	0,4756	0,0476		
<b>Total</b>	11	471,9774			

	<i>Coefficients</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
<b>Intercepción</b>	0,69431	0,13421	5,17310	4,17E-04	0,39526	0,99335
<b>Variable X 1</b>	0,07263	0,00073	99,57266	2,56E-16	0,07101	0,07426

#### ANÁLISIS DE RESIDUALES

<i>Observación</i>	<i>Pronóstico para Y</i>	<i>Residuos</i>	<i>(Residuos/pronóstico)*100</i>
1	2,5101	-0,3200	-12,7487
2	4,3260	0,2053	4,7455
3	6,1418	-0,2729	-4,4439
4	7,9576	-0,0034	-0,0432
5	9,7734	0,2721	2,7837
6	11,5892	0,0810	0,6988
7	13,4051	0,2233	1,6658
8	15,2209	0,0160	0,1052
9	17,0367	0,2021	1,1865
10	18,8525	-0,0959	-0,5085
11	20,6684	-0,0345	-0,1669
12	22,4842	-0,2731	-1,2145

**Tabla S10. Curva de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtenidas del biosensor HRP/Hap5-NTCf/GC con fortificación de 100 µM en muestras de leche comercial.**

<b>C (µM)</b>	<b>I (µA)</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>Covarianza</b>
25	7,178	0,703	9,791
50	9,114	0,825	9,050
75	10,677	1,225	11,472
100	12,497	1,131	9,052
125	14,012	1,161	8,289
150	15,407	1,653	10,728
175	16,894	1,805	10,682
200	18,281	1,875	10,255

225	19,497	1,823	9,351
250	20,854	2,245	10,763
275	22,147	2,188	9,878

**Tabla S11.** Recuperación de curvas de calibración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtenidas del biosensor HRP/Hap5-NTCf/GC con fortificación de 100 µM en leche comercial.

<b>m</b>	0,063	0,001
<b>b</b>	6,581	0,224
<b>Cm+100µM Fort</b>	105,099	
<b>C muestra</b>	5,559	
<b>C Recuperación</b>	99,540	1,56
<b>%Recuperación</b>	99,540	

**Tabla S12.** Resumen Curvas de calibración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtenidas del biosensor HRP/Hap5-NTCf/GC con fortificación de 100 µM en muestras de leche comercial.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
<b>Coefficiente de correlación múltiple</b>	0,99799
<b>Coefficiente de determinación R<sup>2</sup></b>	0,99598
<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	0,99553
<b>Error típico</b>	0,34769
<b>Observaciones</b>	11

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
<b>Regresión</b>	1	269,603	269,603	2230,212	4,287E-12
<b>Residuos</b>	9	1,088	0,121		
<b>Total</b>	10	270,691			

	<i>Coefficiente s</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
<b>Intercepción</b>	6,5815	0,2248	29,2720	3,09E-10	6,0729	7,0901
<b>Variable X 1</b>	0,0626	0,0013	47,2251	4,29E-12	0,0596	0,0656

#### ANÁLISIS DE RESIDUOS

<i>Observación</i>	<i>Pronóstico para Y</i>	<i>Residuos</i>	<i>(Residuos/pronóstico)*100</i>
--------------------	--------------------------	-----------------	----------------------------------

1	8,147	-0,592	-7,272
2	9,713	-0,028	-0,292
3	11,278	0,168	1,493
4	12,844	-0,004	-0,030
5	14,409	0,251	1,745
6	15,975	0,200	1,253
7	17,540	0,372	2,121
8	19,106	0,235	1,230
9	20,671	0,165	0,798
10	22,237	-0,172	-0,774
11	23,802	-0,595	-2,500

**Tabla S13.** Curva de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtenidas del biosensor HRP/Hap5-NTCf/GC HRP/Hap5-NTCf/GC con Fortificación de 150  $\mu$ M en muestras de leche comercial.

C ( $\mu$ M)	I ( $\mu$ A)	Desviación Estándar	Covarianza
25	9,439	0,702	7,439
50	11,066	0,750	6,777
75	12,517	0,989	7,901
100	14,438	1,035	7,166
125	15,737	0,755	4,798
150	17,276	1,446	8,368
175	18,475	1,186	6,421
200	20,054	1,525	7,604
225	21,257	1,453	6,835
250	22,188	1,267	5,711
275	23,407	1,102	4,708
300	24,948	1,533	6,145

**Tabla S14.** Recuperación de curvas de calibración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtenidas del biosensor HRP/Hap5-NTCf/GC con Fortificación de 150  $\mu$ M con leche comercial.

<b>m</b>	<b>0,05561</b>	<b>0,00117</b>
<b>b</b>	8,53043	0,21582
<b>Cm+150µM Fort</b>	153,26235	
<b>C muestra</b>	5,5596	
<b>C Recuperación</b>	147,7028	5,989
<b>%Recuperación</b>	98,4685	3,989

**Tabla S15.** Resumen Curvas de calibración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtenidas del biosensor HRP/Hap5-NTCf/GC con fortificación de 150 µM en muestras de leche comercial.

<b>Estadísticas de la regresión</b>	
<b>Coefficiente de correlación múltiple</b>	<b>0,99778</b>
<b>Coefficiente de determinación R<sup>2</sup></b>	0,99557
<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	<b>0,99512</b>
<b>Error típico</b>	0,35067
<b>Observaciones</b>	<b>12</b>

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
<b>Regresión</b>	1	2,76E+02	2,76E+02	2,25E+03	4,20E-13
<b>Residuos</b>	10	1,2297	0,1230		
<b>Total</b>	11	277,6073			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
<b>Intercepción</b>	8,5304	0,2158	39,5250	2,57E-12	8,0495	9,0113
<b>Variable X 1</b>	0,0556	0,0012	47,4078	4,20E-13	0,0530	0,0582

#### ANÁLISIS DE RESIDUALES

<i>Observación</i>	<i>Pronóstico para Y</i>	<i>Residuos</i>	<i>(Residuos/pronóstico)*100</i>
1	9,9207	-0,4814	-4,8523
2	11,3109	-0,2446	-2,1623
3	12,7011	-0,1836	-1,4459
4	14,0913	0,3469	2,4619
5	15,4815	0,2552	1,6482
6	16,8717	0,4038	2,3936
7	18,2620	0,2126	1,1640
8	19,6522	0,4018	2,0448
9	21,0424	0,2149	1,0212
10	22,4326	-0,2449	-1,0916
11	23,8228	-0,4159	-1,7457
12	25,2131	-0,2649	-1,0505