

34
21



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUÍMICA



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA**

Construcción de un biosensor

**selectivo a urea con base en un
transductor de POSAI**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A
Gloria García Ramírez



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México D.F.

1997



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	PROF. UGALDE VARGAS REBECA
VOCAL	PROF. ALVAREZ RUIZ MARIA MAGDALENA
SECRETARIO	PROF. BAEZA REYES JOSE ALEJANDRO
1er. SUPLENTE	PROF. CARRANCO PEREZ ANA ISABEL
2do. SUPLENTE	PROF. RAMOS MEJIA AURORA DE LOS ANGELES

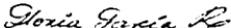
SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA LABORATORIO DE
ELECTROQUIMICA ANALITICA, 3F, ANEXO DE POSGRADO,
EDIFICIO "A" DE LA FACULTAD DE QUIMICA.

ASESOR



Candidato a Doctor José Alejandro Baeza Reyes

SUSTENTANTE


Gloria García Ramírez

Nunca te conceden un deseo sin concederte la facultad de convertirlo en realidad

Diamantes

Si vídramos una piedra de diamante en bruto, no la evaluáramos como un cristal atractivo. Cuando los romanos comenzaron a llevar diamantes de la India, los usaban por su dureza y fortaleza, no por su belleza.

Se piensa que el corte de los diamantes se originó en la India en el siglo XV. El arte de cortar otro tipo de piedras es más antiguo, pero la belleza secreta de los diamantes tardó en ser revelada, solo se usaban por su dureza. En algún momento a alguien se le ocurrió frotar un diamante contra otro y desde entonces el mundo dejó de ser el mismo.

Una cosa es saber que un diamante corta a otro diamante y otra muy distinta, efectuar el proceso. Esto implica seis pasos y si alguno no se lleva a cabo adecuadamente, el diamante se arruina.

Primero se marca la piedra para saber cómo debe cortarse de modo que se obtenga el diamante de mayor valor posible.

Después comienza el corte, solo hay una oportunidad de cortar. Un experto debe determinar el sentido de la vena del diamante en bruto y cortar a lo largo. Esta es una labor larga, precisa y ardua. Un disco de 35/10,000

de pulgada de espesor, cubierta con polvo de diamante abrasivo penetra en el diamante durante unos cuatro u ocho horas.

El proceso de redondeo se realiza colocando el diamante en un torno y se hace redondo mediante la acción de más polvo de diamante.

El último paso es el de facetar. Con una rueda plana de acero pulido y cubierta con polvo de diamante la gema recibe sus muchas facetas.

Cuando se trata de personas y no de gemas, cada uno al trabajar sobre la vena hace una incisión en el otro, si esta resulta bien el modelado y el pulido continúan hasta que los descubren las brillante facetas que cada uno puede hacer bratar del otro y aunque suene doloroso, esto no es una tortura (por lo general).

Aunque pienso que aún falta para que yo llegue a ser una gema con todas las facetas posibles bien pulidas debo dar las gracias a todos aquellos que se han atrevido a hacer cortes y a emplear su propio polvo de diamantes para comenzar el trabajo de pulirme, a todos aquellos que me han dado...

Fuerza para conocerme

Esperanza de que mi vida sea mejor

Tornura cuando me fue necesario

Salaz para mi pena

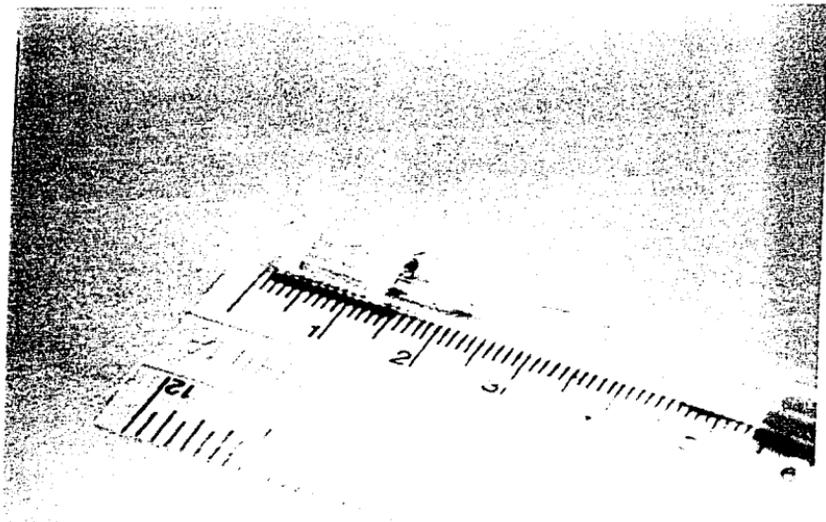
Yo si me faltaba

Comprensión cuando estuve confundida

*Retos para que cambiara
Paciencia cuando desesperaba
Apoyo cuando intenté algo
Aceptación si fallé
Fuerza para seguir adelante
Sabiduría para crecer
Reconocimiento de mis logros
Guta hacia metas superiores
y sobre todo, gracias a aquellos que
han sido y serán un ejemplo que
sostendrá y nutrirá a la persona
en que me estoy convirtiendo.
¡ Gracias por preocuparse !
Les Amo*

Gloria García R.

Construcción de un biosensor selectivo a urea con base en un transductor de POSAI



Los resultados presentados en este trabajo son originales y parte de ellos se presentaron en el XII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Electroquímica Analítica, celebrado en la ciudad de Guanajuato, Gto. del 9 al 11 de junio de 1997.

Los resultados que aquí se presentan se obtuvieron en los experimentos realizados del 1 de enero al 2 de julio de 1997.

ÍNDICE

	Página.
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
ANTECEDENTES	
1. Breve reseña de biosensores.	6
2. Importancia de la urea como analito en fluidos biológicos.	11
3. Descripción de los biosensores más comunes para determinar urea.	13
4. Propuesta del trabajo de esta investigación.	16
4.1 Objetivos	16
CAPÍTULO II	
PARTE EXPERIMENTAL DESARROLLO Y RESULTADOS.	
1. Obtención y control del extracto de ureasa	
1.1 Extracción	17
1.2 Ensayo de la actividad de ureasa en harina de soya y en el extracto	17
2. Construcción del sensor de POSAI (película de óxido sobre acero inoxidable)	
2.1 Oxidación del acero	20
2.2 Curvas de monitoreo y calibración con los sensores de POSAI	21
3. Construcción del biosensor	
3.1 Montaje	28
3.2 Curvas de actividad	31

3.3	Curvas de calibración sin renovación del extracto enzimático	34
3.4	Curvas de calibración con renovación del extracto enzimático.	37
4.	Determinación de urea en muestras de suero humano	40
5.	Comparación del método electroquímico con el método espectrofotométrico habitual de la diacetilmonoxima.	41
CAPÍTULO III		
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES		44
ANEXO I Ejemplo de regresión lineal obtenida con el programa EXCEL 5 de Microsof Office		
		49
ANEXO II Cálculos para determinar la eficiencia del sensor de POSAI		51
ANEXO III. Método espectrofotométrico de la diacetilmonoxima para determinar urea en fluidos biológicos		53
ANEXO IV Prueba de significación para saber si los promedios de dos conjuntos de mediciones son iguales.		57
BIBLIOGRAFÍA.		59

INTRODUCCIÓN

La urea es uno de los principales productos del catabolismo de las proteínas en los mamíferos. Los grupos α -amino de los aminoácidos provenientes de las de las proteínas de la dieta y tisulares se excretan como urea. Su fórmula mínima es $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, se sintetiza en el hígado, pasa al torrente sanguíneo y la filtran los riñones para eliminarse en la orina.

Cuando la concentración de urea en la sangre y la orina aumenta o disminuye notablemente se debe por lo general a un problema en el metabolismo, a un problema hepático, renal, de vías urinarias o a una muy mala nutrición cuyo diagnóstico debe ser apoyado por los resultados obtenidos en el laboratorio.

Se han desarrollado diversos métodos para medir la concentración de urea en fluidos biológicos. De entre estos métodos los más exactos y precisos son aquellos en los cuales se utiliza a la enzima ureasa para catalizar la hidrólisis de la urea y se monitorea la formación de alguno de los productos de la hidrólisis o bien el consumo de algún producto de una reacción acoplada. Casi todos estos métodos son costosos y las técnicas suelen ser elaboradas o requieren de instrumentos que no están al alcance de todos los laboratorios.

Después del auge que han tenido los electrodos ion-selectivos, (ISEs), "Czaban (1985)", muchos investigadores los han empleado para acoplarles enzimas inmovilizadas, u otras moléculas biológicamente activas, con las que se han obtenido sensores que pueden monitorear a los sustratos de dichas enzimas, por ejemplo. Los

sensores, basados en el uso de un transductor potenciométrico o amperométrico y un elemento bioselectivo, se conocen como *biosensores*

Entre estos dispositivos se han desarrollado varios tipos de biosensores capaces de monitorear urea en fluidos biológicos, pero tienen limitaciones considerables para poder emplearse en la enseñanza. Por ejemplo, suelen construirse usando un electrodo ion-selectivo como transductor potenciométrico, estos electrodos son caros y muchas veces presentan interferencias químicas importantes, sobre todo de los demás iones presentes en los fluidos biológicos en concentraciones considerables, lo que ocasiona errores en las determinaciones de urea.

Algunos de los biosensores selectivos a urea reportados en la literatura podrían construirse en los laboratorios de enseñanza universitaria, pero los ISEs en que se basan son caros o los materiales para construirlos no son fáciles de conseguir.

En los cursos de Química Analítica Instrumental que se imparten en la Facultad de Química se estudia a los sensores potenciométricos, como son los ISEs, así como a sus aplicaciones en el desarrollo de biosensores y en el análisis, pero debido a su alto costo no hay prácticas de laboratorio que ilustren su diseño, construcción y aplicación al análisis de muestras problema.

Es necesario introducir prácticas que involucren la construcción y la aplicación de biosensores, pero ¿Cómo se podría construir un biosensor sin gastar en un ISE?

¿Qué materiales podrían usarse en su elaboración que se consiguen en el país y no sean caros?

¿Cómo tener una enzima de actividad aceptable pero sin invertir mucho tiempo y dinero en su purificación o sin tener que comprarla purificada?

En este trabajo se propone el diseño y construcción de un biosensor selectivo a urea que puedan construir los alumnos de los cursos de laboratorio de Química analítica Instrumental y pueda usarse en la determinación del analito, en muestras problema, durante las sesiones de práctica

Para que la construcción y aplicación del biosensor resulte de un costo accesible se propone utilizar como transductor potenciométrico **películas de óxidos sobre acero inoxidable**, (POSAI). pues se ha reportado que estas películas son selectivamente sensibles a la actividad de H^+ en diversos medios de reacción "Nomura and Ujihira (1988), García, Pérez y Marquez (1997)" Además, hasta donde se sabe no se ha reportado el uso de POSAI como transductores en biosensores

También se propone emplear un extracto crudo acuoso de ureasa de soya en lugar de la enzima purificada lo que baja aun mas el costo del biosensor

Después de obtener POSAI que pasaron las pruebas de tiempo de respuesta, calibración con amortiguadores y eficiencia, se eligió una para armar el biosensor Este se construyó con tubos de vidrio y de plástico que se consiguen fácilmente, se usó alambre de cobre como conductor y una membrana de diálisis para atrapar físicamente a la enzima porque esta membrana permite el paso del sustrato

Con el biosensor construido se hicieron curvas de actividad de la enzima $pH = f(t)$ con diferentes concentraciones de urea en el medio de reacción Se determinaron los incrementos de pH obtenidos a un tiempo dado y se trazaron las curvas de calibración $\Delta pH = f(\text{Log} [\text{urea}])$ para distintos intervalos de concentración Todo esto, primero, sin cambiar la capa de extracto en el biosensor y posteriormente

cambiando el extracto entre determinaciones, pues así se acortan los tiempos de lavado del biosensor

Una vez que se determinó el mejor intervalo de concentración para trabajar con muestras biológicas se incluyó la determinación de urea en muestras de suero humano por cuadruplicado con cada nueva curva de calibración. Para cada muestra y con objeto de comparar los resultados obtenidos con los dos métodos se realizó también la determinación de urea por cuadruplicado usando el método de la diacetilmonoxima (DAM)

El trabajo se estructuró de la siguiente forma

En un primer capítulo se hace una breve reseña del desarrollo de algunos sensores químicos, desde los electrodos ion-selectivos hasta su aplicación en el diseño de distintos biosensores. Se menciona también por qué es importante la cuantificación de urea en sangre y orina, y se describe el diseño y funcionamiento de los biosensores para urea más comunes reportados en la literatura. También se definen los objetivos y se puntualiza la propuesta de este trabajo.

En un segundo capítulo se trata la parte experimental. La obtención del extracto crudo acuoso de ureasa de soja y los ensayos de actividad, la obtención de las POSAI y las pruebas que se hicieron para elegir a la mejor de ellas para construir el biosensor, la construcción del biosensor, las curvas de actividad y calibración, la determinación de urea en muestras de suero y la comparación con el método de la DAM.

En el tercer capítulo se discuten los resultados y se presentan las conclusiones del trabajo así como las perspectivas del mismo.

Al final hay cuatro anexos, en el primero se muestra un ejemplo del análisis de regresión lineal que se realizó para obtener la eficiencia de las POSAI y para las curvas de calibración de urea

En el anexo II se describe el método espectrofotométrico de la diacetilmonoxima para la determinación de urea, su fundamento y los pasos a seguir.

En el anexo III se muestra la manera en que se realizaron los cálculos para la prueba de hipótesis nula que se llevo a cabo para determinar si hay diferencias estadísticamente significativas entre la media de los resultados obtenidos usando el biosensor construido y los obtenidos con el metodo de la DAM

Por último se incluye la bibliografía

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. Breve Reseña de Biosensores

Actualmente se hacen determinaciones de muchos analitos mediante sensores químicos, éstos han tenido auge y los investigadores han puesto mucho interés en el desarrollo de nuevos y mejores sensores desde hace unos veinte años, aunque su producción a gran escala y comercialización puede en muchos casos tomar hasta diez años.

Inicialmente, los sensores químicos se clasifican como potenciométricos y amperométricos. En los sensores potenciométricos, una membrana o superficie sensitiva, actúa como una batería, generando un potencial proporcional al logaritmo de la actividad del analito, éste potencial se mide con respecto a un electrodo de referencia que se encuentra en contacto con la muestra. Como muchas membranas son malas conductoras las mediciones potenciométricas se hacen a un flujo de corriente casi nulo. El flujo de corriente tiende a descargar la batería y a perturbar el equilibrio en la interface membrana-muestra.

Por otra parte, en los sensores amperométricos se aplica un potencial entre el electrodo de trabajo y el de referencia, esto provoca una transferencia de electrones, y se presenta una reacción redox que causa un flujo de corriente proporcional a la concentración del analito.

Los sensores potenciométricos pueden emplearse en determinaciones directas o indirectas, cada una de las cuales muestra ventajas y desventajas.

En las pruebas directas el sensor se pone en contacto con la muestra sin diluir, sin algún tratamiento previo. lo que es una ventaja para los laboratorios clínicos que atienden emergencias, pero tienen la desventaja de que las mediciones son sensibles al coeficiente de actividad y a errores en el potencial residual de unión líquida. Con la potenciometría indirecta la muestra se diluye antes de la medición de modo que no es necesario preocuparse mucho por los potenciales de unión líquida y los coeficientes de actividad, porque sus efectos son minimizados por el diluyente. La desventaja es que puede haber errores en la medición si hay muchos sólidos suspendidos en la muestra. La potenciometría indirecta es popular y ha sido históricamente la competidora de los métodos de referencia, como la espectrofotometría de flama.

Los primeros sensores potenciométricos que hubo fueron los electrodos ion-selectivos de vidrio (ISEs), (1909 - 1936) y luego el analizador de gases sanguíneos (1958), que puede medir pH, P_{CO_2} y P_{O_2} . "Rechnitz, G.A.(1967)". A finales de los años 60 fue construido el primer sensor que incorporaba una enzima para medir la concentración del sustrato de dicha enzima "Clark, L.C. and Layons, C. (1962)". Uno de los eventos más importantes en la historia de los sensores químicos fue el desarrollo del electrodo para K^+ que utiliza valinomicina como acarreador neutro (1969) "Durst, R.A.(1969)". Antes del desarrollo de este sensor era posible tener electrodos de vidrio (ISEs) para el ion sodio que funcionaban muy bien, pero no había electrodos para el ion potasio, y tenía que determinarse por el método de espectrofotometría de flama. Con el advenimiento de un electrodo ion-selectivo para potasio se pensó que podría llegar a reemplazarse la espectrofotometría de flama con ISEs. "Cazban Jhon D. (1985)". En los años setenta comenzó a florecer la

instrumentación basada en microprocesadores con lo que aumentó la popularidad de la potenciometría. En la década de los ochenta ya los ISEs se estaban haciendo populares y se utilizaban cada vez más en los laboratorios clínicos "Czaban Jhon D. (1985)".

El área de análisis de electrolitos mediante ISEs ya no es un área en crecimiento ahora es más importante desarrollar el área de análisis de metabolitos, donde los biosensores basados en enzimas están teniendo auge

En términos generales un biosensor puede pensarse como un dispositivo que incorpora una sustancia bioactiva (enzimas o sistemas multienzimáticos, componentes membranales, citocromos, hormonas, anticuerpos, microorganismos, etc.) que reconoce específicamente a una especie de interés (analito) puesta en íntimo contacto con un sistema transductor (Dispositivo basado en el uso de un sistema para reconocer algún ion y que es capaz de transformar esa información química en una señal eléctrica, por ejemplo un ISE) Debido a que los materiales biológicamente sensitivos son los responsables de reconocer al analito, también regulan la especificidad y sensibilidad del sensor "Frew, Jane E. And Allen H. (1987)".

El concepto principal en el diseño de biosensores que incorporan enzimas ha sido usar una membrana para aislar y transformar el analito deseado en especies que puedan monitorearse potenciométrica o amperométricamente. Por lo general las membranas son composites multicapa que contienen una o más enzimas inmovilizadas. Cuando estos composites se ponen en contacto con el sustrato de la enzima, es decir, con el analito, este llega a la membrana para transformarse por la

acción de la enzima de modo que los productos puedan ser detectados por el sensor potenciométrico o amperométrico. Como las enzimas se deben encontrar inmovilizadas pueden reutilizarse, con lo que se abaten los costos, este concepto es versátil y puede ser aplicado para gran cantidad de analitos.

Otro concepto que se está desarrollando es el uso de la lisis mediada por complemento para inmunosensores con detectores electroquímicos, esta técnica es atractiva porque tiene una alta sensibilidad ya que conlleva un efecto amplificador debido a que por cada célula lisada muchos marcadores se liberan dentro de la muestra "Czaban (1985)"

Existe también el concepto de sensores por bioafinidad "Thompson and Krull (1984)", en los que por ejemplo un electrodo sensible a oxígeno se pone en contacto con una membrana en la que ha sido inmovilizado el ácido 4-hidroxifenilazo-benzóico (HABA), el HABA está conjugado con una proteína ligada a avidina, la cual a su vez está marcada con catalasa. La biotina (analito) tiene mayor afinidad con la avidina que con el HABA de modo que cuando la biotina se agrega al sistema, desplaza al HABA reduciendo la enzima al electrodo, entonces, si se adiciona peróxido reacciona con la catalasa formando O_2 . La adición de peróxido puede usarse para monitorear la cantidad de enzima que queda en la membrana, lo que se relaciona con la cantidad de biotina presente. Al aumentar la concentración de biotina la corriente en el electrodo de oxígeno disminuye. El analito no necesita estar marcado, es posible la regeneración del electrodo y la sensibilidad aumenta gracias a la amplificación enzimática. Este tipo de ensayo se aplica a la determinación de moléculas pequeñas como hormonas y drogas.

Hay también biosensores basados en células, sobre todo aquellos que incorporan microorganismos y usan como transductores sensores electroquímicos las células se fijan entre la membrana sensitiva (transductor) y la membrana que los retiene en contacto con el cuerpo del sensor. por lo general una membrana de diálisis o micropore. Su principio de operación es semejante al de los biosensores basados en enzimas, tienen la ventaja de poder regenerarse si se guardan en el medio de cultivo adecuado, lo cual aumenta su tiempo de vida. Las desventajas que presentan son que pueden ser poco selectivos y que requieren de 3 a 4 horas para recobrar sus condiciones originales entre una y otra determinación "Montalvo J.G.(1970)".

Un concepto más que se está desarrollando es el de los transistores de efecto de campo químicamente sensitivos (CHEMFETs), sobre todo para determinaciones in vivo. "Czaban (1985)"

Hay moléculas que tendrían que cuantificarse en concentraciones de 10^{-12} M y actualmente los sensores más sensibles logran monitorear bien concentraciones de 10^{-3} M, de modo que aún queda trabajo por hacer pues la incorporación de uno o más pasos de amplificación puede ayudar a incrementar la sensibilidad.

La miniaturización es otra consideración importante para los nuevos diseños, especialmente si se intenta realizar determinaciones in vivo. Hay ISEs de estado sólido que miden de uno a dos mm. de diámetro y podrían hacerse más pequeños.

Los microelectrodos con diámetro de micrómetros podrían probarse en el área de biosensores.

Algunos electrodos microvoltamétricos se han empleado para medir cambios de compuestos electroactivos en el cerebro de algunos mamíferos y se consideran ideales para este tipo de electroanálisis in vivo "Rechnitz (1982)".

2. Importancia de la Urea Como Analito en Fluidos Biológicos

En los mamíferos, los grupos α - amino de los aminoácidos derivados de la dieta o de la degradación de las proteínas tisulares se excretan como urea, que se sintetiza en el hígado, pasa a la sangre y se elimina en la orina

La concentración de urea en el suero varía bastante en los individuos sanos y está influenciada por factores como la ingesta dietética de proteínas y el estado de hidratación. La disminución o el aumento de la excreción de urea y de su concentración en la sangre y en la orina indica que existe algún problema metabólico, un mal funcionamiento hepático renal o una muy mala nutrición

La acción de los glucocorticoides y las hormonas tiroideas tiende a incrementar los niveles de urea en la sangre. Los andrógenos y la hormona del crecimiento reducen la formación de urea por su efecto anabólico

El aumento en los niveles séricos de urea que se observa en muchos casos de hemorragia gastrointestinal masiva se explica por el incremento notable de la absorción de aminoácidos después de la digestión de las proteínas de la sangre y por la hipovolemia debida a la hemorragia

Al aumentar el catabolismo de las proteínas también aumenta el nivel sérico de urea, como en los casos de fiebre, estrés y quemaduras

Cuando la causa del aumento de los niveles séricos de urea es una enfermedad renal con disminución de la filtración glomerular suele haber deshidratación y edema, lo que provoca reducción de la perfusión renal, incremento del catabolismo de proteínas y del efecto antianabólico general de los glucocorticoides. Se puede presentar uremia con acidosis, desequilibrio hídroelectrolítico, náuseas, vómito, anemia, alteraciones neuropsiquiátricas y coma. El aumento de los niveles de urea varía en magnitud y supera generalmente los 100 mg/dl (16.67 mM) según se indica en la literatura "Barnard J. H. (1984)"

En ocasiones el aumento de los niveles de urea en sangre se debe a una obstrucción del tracto urinario, lo que provoca que la urea se reabsorba en la circulación. A veces los niveles séricos de urea aumentan por perforación del tracto urinario inferior, lo que ocasiona extravasación de orina al interior de los tejidos blandos.

En casos normales de ingesta de proteínas, hidratación, perfusión renal e integridad del tracto urinario inferior, los niveles séricos de urea aumentarán notablemente hasta que la filtración haya disminuido por lo menos un 50%

La disminución significativa de los niveles séricos de urea solo se observa en algunas alteraciones, además de una mala nutrición, la ingesta alta de líquidos o la administración excesiva de líquidos por vía intravenosa en presencia de función renal normal resultarán en una disminución de los niveles séricos de urea, puesto que se reabsorberá en los tubos renales una cantidad relativamente pequeña de urea.

La tendencia hacia una disminución del nivel sérico de urea en el embarazo es probablemente el resultado de un aumento de la filtración glomerular. Por otra parte,

la enfermedad hepática grave puede provocar reducción de la síntesis de urea debido a la menor actividad de su ciclo

Existen diversos métodos para determinar la concentración de urea en sangre, suero, plasma y orina pero son caros y requieren de algún tratamiento previo de la muestra, los que más se usan en los laboratorios se encuentran en los libros de texto "Henry (1994), Bauer (1986)".

Hay trabajos que muestran la construcción de biosensores selectivos a urea, basados en el uso del electrodo de vidrio o de un electrodo selectivo al ion amonio, al amoniaco o al dióxido de carbono, para detectar cambios en la concentración de los productos de la hidrólisis de la urea por acción de la ureasa, solo que existe la limitación de que esos electrodos ion-selectivos son muy caros o los materiales para construirlos no son fáciles de obtener

3. Descripción De Los Biosensores Más Comunes Para Determinar Urea.

J G Montalvo diseñó un sensor para ureasa en el que hacía pasar continuamente una capa de disolución de urea en contacto con una membrana de diálisis que la separaba de una capa de ureasa en solución y de un ISE para NH_4^+ "Montalvo (1970)" La urea difunde a través de la membrana de diálisis, es hidrolizada por la ureasa y el ion amonio resultante se monitoréa potenciométricamente con el ISE

Se han hecho biosensores selectivos a urea empleando como transductor un electrodo de vidrio para detectar los cambios en el pH generados cuando la urea es hidrolizada por la ureasa "Guilbault (1976)" Se coloca sobre el bulbo de vidrio una

pasta formada con la enzima y se cubre con una membrana de diálisis, fijándola con un anillo elástico, el sensor se acondiciona en el medio de reacción para que salga el aire atrapado entre el vidrio y la membrana, y posteriormente se sumerge en la muestra, la urea pasa a través de la membrana y es hidrolizada por la ureasa, el medio se alcaliniza y el cambio de pH es monitoreado por el electrodo de vidrio, el cambio de pH es proporcional a la concentración de urea en la muestra

En 1994 se construyó un biosensor selectivo a urea usando como transductor un ISE para amonio hecho con nonactina como acarreador de iones, en una matriz de PVC sobre un composite conductor de grafito y resina epoxica "**Martinez-Fàvregas and Alegret (1994)**". En contacto con este transductor colocaron una capa de ureasa y la cubrieron con una membrana de diálisis fija con un anillo elástico. La urea en solución pasa a través de la membrana de diálisis, es hidrolizada por la ureasa y el amonio producido se monitorea con el ISE

Se han reportado electrodos en los cuales la enzima se ha inmovilizado atrapándola físicamente en gel de poliacrilamida "**Mosbach, Nilsson and Akerlund (1973)**", lo que la hace estable durante más tiempo. También se han reportado sensores en los que la enzima se fija formando el polímero que la contiene directamente sobre la superficie del transductor (electrodos de vidrio para H⁺ o para amoniaco) "**Guilbault (1976)**", lo que hace a estos biosensores más eficientes y durables, pero aumenta mucho el costo. Por ejemplo, se construyó un biosensor selectivo a urea para el cual se polimerizó ureasa directamente sobre la superficie de un electrodo selectivo para amoniaco gaseoso *Oron* "**Anfalt, Granelli and Jagner (1973)**". Se producía suficiente amoniaco si el pH se mantenía entre 7 y 8 haciendo

posible la determinación de urea aún en presencia de cantidades considerables de sodio y potasio, que interfieren cuando se usa un electrodo selectivo para el ion amonio.

En disolución acuosa usualmente se pierde con rapidez la actividad catalítica, haciendo problemático y costoso el uso de reactivos enzimáticos. A veces la enzima solubilizada puede ser oxidada por el O_2 del aire o su estructura terciaria es destruida en la interface aire-agua. Las enzimas también son sensibles al calor y al ataque de microorganismos. Muchas de estas dificultades pueden eliminarse o minimizarse con la inmovilización. Al fijarse en un soporte inerte las enzimas pueden permanecer insolubles con lo que retienen su actividad catalítica. Una enzima inmovilizada puede ser estable por semanas y hasta por varios meses. Mas aún, el tiempo de vida y la velocidad de decaimiento de la actividad se vuelven más predecibles. Otra ventaja de usar el derivado enzimático insoluble es la facilidad con que puede separarse del medio de reacción para reutilizarse. Se han desarrollado diversos métodos para inmovilizar enzimas con objeto de usarlas en analisis químico. Los soportes que se han usado para inmovilizarlas han sido desde esferas de acero inoxidable hasta algunas proteínas "Gray, Keyes and Watson (1977)". Los métodos generales para inmovilizar enzimas se encuentran en *Methods in Enzimology* "Mosbach (1976)".

4. Propuesta del Trabajo de Esta Investigación

En este trabajo se propone construir un biosensor selectivo a urea de bajo costo por medio de un transductor de POSAI (no reportado en la literatura) y extractos crudos de ureasa de frijól de soya.

4.1 Objetivos

4.1.1 Utilizar Como transductores películas de óxidos sobre acero inoxidable, (POSAI), para monitorear los cambios de pH generados por la hidrólisis de urea debida a la acción de la ureasa proveniente de un extracto crudo acuoso de soya, pues se ha reportado que dichas películas son selectivamente sensibles a la actividad del ion H^+ en distintos medios " García et al. (1997), Nomura et al. (1988)".

4.1.2 Utilizar el extracto crudo acuoso de soya en lugar de ureasa purificada debido a su bajo costo

4.1.3 Emplear materiales baratos y hechos en el país

4.1.4 Aplicar el biosensor construido al análisis de muestras biológicas y comparar los resultados que se obtengan con otro método que se use rutinariamente en la clínica

CAPÍTULO II

PARTE EXPERIMENTAL: DESARROLLO Y RESULTADOS

1. Obtención y control del extracto crudo acuoso de ureasa

1.1 Extracción

Se obtuvo harina finamente molida en un mortero de porcelana, a partir de frijol de soya, pues la harina comercial generalmente recibe tratamientos que desactivan la ureasa

En un vaso de precipitados de 100 mL se colocaron 10 g de harina y 50 mL de agua destilada, la mezcla se mantuvo en baño María a una temperatura de 28 °C, y en agitación con un agitador magnético *Lindberg*, durante 5 minutos, posteriormente se dejó reposar y se pasó a través de una maya de nylon para separar las partículas más grandes, después se centrifugó a 3500 rpm en una centrifuga *Roto Uni II de Instrumenta S.A* durante 10 minutos para separar la mayor cantidad posible de sólidos. El sobrenadante se guardó en refrigeración. La parte básica del método de extracción fue tomada de "Methods in Enzymology" "Summer (1955)".

1.2 Ensayo de la actividad de ureasa en la harina de soya y en el extracto

a) En una celda de 25 mL se colocaron 10 mL de KNO_3 0.05 F y 100 mg de harina recientemente obtenida a partir de frijol de soya. Se hizo primero una adición de 100 μL de urea R.A. al 0.166 M y se mantuvo en agitación con un agitador magnético *Ludberg*. Los cambios de pH generados por la acción de la enzima se monitorearon con un potenciómetro *Sargent Welch modelo SLX* de escala expandida y

un electrodo combinado de vidrio *Corning, modelo 476561* Posteriormente se repitió la prueba con 10 adiciones de 10 μL de urea 0.166 M. cada una. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1, en esta se observa cómo el pH aumenta con la adición de 100 μL de urea en el primer ensayo y luego cómo aumenta gradualmente con cada adición de urea hasta alcanzar prácticamente el mismo pH que en el primer ensayo.

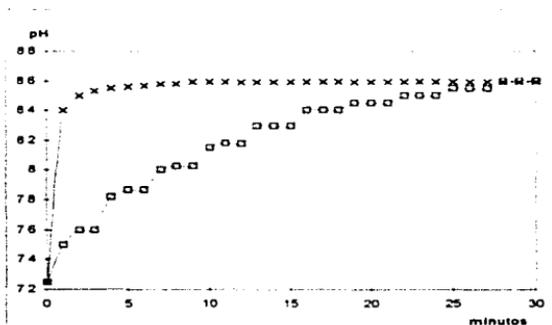


FIGURA 1. monitoreo de la actividad de ureasa en 100 mg de harina de soya en 10 mL de KNO_3 0.05 F con un electrodo combinado de vidrio $\text{pH} = f(t)$
 X = 100 μL de urea o 166 M. Q = de 10 en 10 μL de urea 0.166 M

Ambos ensayos se repitieron usando el POSAI y un electrodo de calomel saturado marca *Fisher Accumet modelo 13-620-52* como referencia, los resultados se muestran en la figura 2. Esto mostró que el POSAI puede monitorear los cambios de pH generados por la hidrólisis de la urea catalizada por la ureasa de soya.

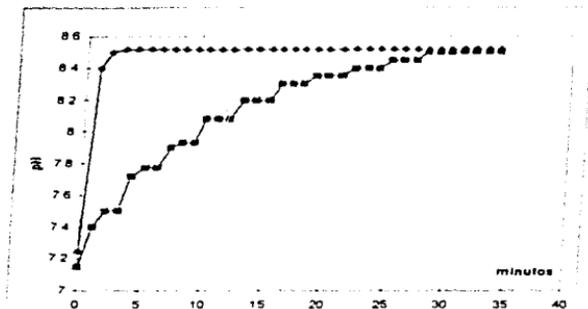
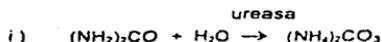


FIGURA 2. Monitoreo de la actividad de ureasa en 100 mg de harina de soya en 10 mL de KNO_3 0.05 F con el sensor de PQSAI
 ◆ = 100 µL de urea 0.166 M ■ = de 10 en 10 µL de urea 0.166 M

Como control, en una celda de 25 mL se colocaron 10 mL de medio de reacción y 100 mg. de harina, se midió el pH cada minuto durante 15 minutos y se encontró que permanecía constante. También se hizo un ensayo en el que en una celda de 25 mL se colocaron 10 mL de medio de reacción y 100 µL de urea, se midió el pH durante 15 minutos y se encontró que permaneció constante.

b) En cada uno de 12 tubos de ensayo se colocó un mL de medio de reacción, una gota de fenolftaleína y 100 µL de disolución de urea 0.166 M. El primer tubo sirvió de control, a los siguientes se les adicionó 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, y 100 µL de extracto crudo acuoso de ureasa de soya respectivamente. Se comprobó la alcalinización del medio por el vire del indicador y se encontró que después de 2 minutos el indicador había virado en todos los tubos menos en el control. Esto fue

considerado como una prueba de que había actividad de ureasa en el extracto.

2. Construcción del sensor de POSAI

2.1 Oxidación del acero

Un trozo de barra cilíndrica de acero inoxidable tipo 316 de mm de diámetro se cortó en tramos de 6 mm. Cuatro de los trozos resultantes se pulieron mecánicamente por una de sus caras hasta grado de espejo, se lavaron y desengrasaron con alcohol y acetona posteriormente se sumergieron en una disolución de óxido de cromo (VI) 2.5 M en ácido sulfúrico 5 M en baño María a 70 °C, inicialmente de 10 a 30 minutos como se reporta en la literatura "**Nomura and Ujihira (1988)**", pero no se obtuvieron capas de óxidos sobre el acero uniformes a la exploración visual, y al probarlas se encontró que nunca pudieron calibrarse con amortiguadores, por lo que se decidió alargar el tiempo de oxidación y repetir las pruebas. A un tiempo de 2 horas se obtuvieron las mejores POSAI.

Después de 2 horas de reacción, los trozos de acero oxidados se enjuagaron y se montaron cada uno en un tubo de plástico con diámetro interior de 6 mm, se conectaron a conductores de cobre mediante una gota de mercurio para tener lo que se llamó *sensores de POSAI* y se calibraron con amortiguadores de pH = 4, pH = 7 y pH = 10 pero se obtuvieron lecturas inestables así como tiempos de respuesta de hasta 10 minutos. Los sensores de POSAI se dejaron reposar en agua destilada toda la noche y al parecer eso sirvió para estabilizar la capa de óxidos formada, ya que cuando se repitieron las pruebas de calibración al día siguiente se tuvieron lecturas

estables y fue posible calibrar los sensores de POSAI con los amortiguadores, en esta ocasión se obtuvieron tiempos de respuesta de entre 5 y 15 segundos al cambiar el sensor de un amortiguador a otro

2.2 Curvas de Monitoreo del pH y Calibración con los sensores de POSAI

2.2.1 *Curvas de monitoreo del pH*

Se realizaron curvas de monitoreo ácido - base con los sensores de POSAI obtenidos para corroborar su utilidad y conocer su eficiencia

Cada sensor se calibró con amortiguador de fosfatos $\text{pH} = 7.0 \pm 0.2$ y con amortiguador de boratos $\text{pH} = 10 \pm 0.2$ antes de realizar con cada uno 3 monitoreos de 300 μL de HNO_3 0.1 F en 5 mL de agua destilada, haciendo adiciones de 40 en 40 μL de NaOH 0.1520 M. Durante cada monitoreo se tomaron lecturas del pH y el potencial después de cada adición de sosa.

Las gráficas típicas de $\text{pH} = f(\text{Vol. de NaOH agregado})$ obtenidas para las curvas de monitoreo se muestran en las figuras 3 y 4.

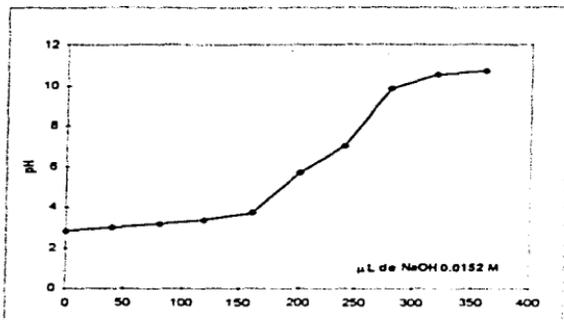


FIGURA 3 Curva de monitoreo de una valoración de 300 μL de HNO_3 0.1 F con NaOH 0.1520 M en 5 mL de agua destilada sensor B-2 $\text{pH} = f(\text{Vol. de titulante})$

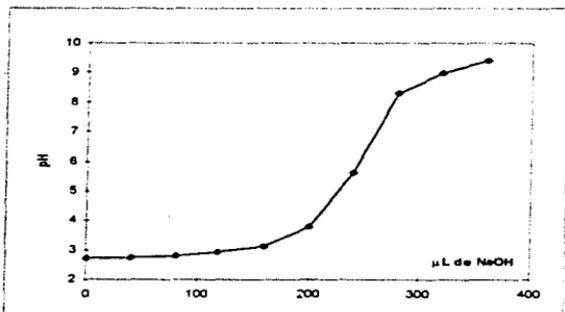


FIGURA 4 Curva de monitoreo de una valoración de 300 μL de HNO_3 0.1 F con NaOH 0.1520 M en 5 mL de agua destilada Sensor B-3. $\text{pH} = f(\text{Vol. de titulante})$

2.2.2 Determinación de la eficiencia de las POSAI

También se trazaron las gráficas de $E = f(\text{pH})$ para dichos monitoreos y se hicieron los cálculos estadísticos necesarios para tener las curvas corregidas por regresión lineal así como para obtener el valor de la eficiencia y la ecuación que representa a cada recta. En el anexo I se muestra un ejemplo de los análisis de regresión lineal obtenidos mediante el programa EXCEL 5 de Microsoft Office que se empleó con este fin.

Las gráficas típicas de $E = f(\text{pH})$ se muestran en las figuras 5 y 6

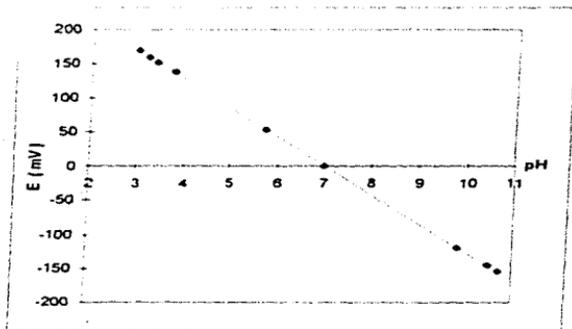


FIGURA 5 Monitoreo de una valoración de 300 μL de HNO_3 0.1F con NaOH 0.1520 M en 5 mL de agua destilada sensor B-2 $E = f(\text{pH})$
Ecuación de la recta $E = (294.96 \pm 0.71) - (42.03 \pm 0.10)(\text{pH})$ $r = 0.9999$

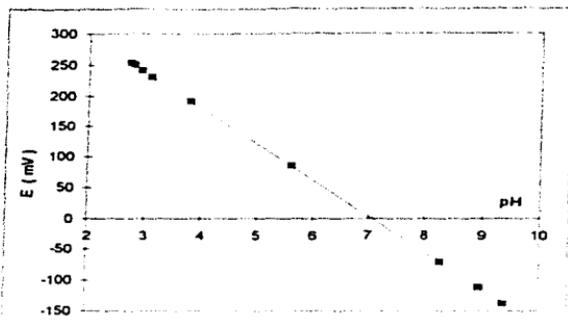


FIGURA 6. Monitoreo de una valoración de 300 μ L de HNO_3 0.1 F con NaOH 0.1520 M en 5 mL de agua destilada sensor B-3 $E = f(\text{pH})$
 Ecuación de la recta: $E = (411.77 \pm 0.81) - (58.33 \pm 0.14)(\text{pH})$ $r = 0.9999$

Se sabe que los cloruros pueden afectar a las POSAI cuando están presentes en el medio de reacción "Nomura et al. (1988)", en los fluidos biológicos, en el suero en particular, hay una concentración de cloruros 0.15 M al igual que de ion Na^+ , también hay una concentración de K^+ 0.005 M "Martínez-Fábregas et al. (1994)". Debido a esto, con el POSAI que mostró mejor eficiencia se repitieron las valoraciones ácido-base pero ahora en un medio con NaCl 0.15 F y KCl 0.005 F

La curva típica $E = f(\text{pH})$ se muestra en la figura 7.

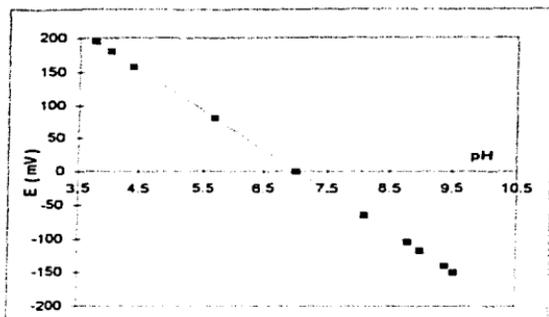


FIGURA 7. Monitoreo de una valoración de 300 μL de HNO_3 0,1 F con NaOH 0,1520 M en 5 mL de medio salino. Sensor B-3. $E = f(\text{pH})$
 Ecuación de la recta $E = (417,97 \pm 0,93) - (59,50 \pm 0,13)(\text{pH})$ $r = 0,9999$

Finalmente, se eligió para construir el biosensor el POSAI B-3, que tuvo durante las valoraciones ácido-base a 24° C (temperatura promedio) en agua destilada, una eficiencia

$$\beta = 99,28 \%$$

La ecuación que representa a la recta $E = f(\text{pH})$ es

$$E = (411,77 \pm 0,81) - (58,31 \pm 0,14)(\text{pH})$$

Coefficiente de correlación lineal de la recta: $r = 0,9999$

Los cálculos para obtener la eficiencia (β) del electrodo se muestran en el anexo II.

2.2.3 Curvas de calibración de urea con la enzima en el medio de reacción usando el POSAI elegido. (B-3)

El POSAI se calibró con amortiguadores pH = 7 y pH = 10, luego se colocó en 10 mL de medio de reacción junto con el electrodo de calomel saturado, se dejó transcurrir aproximadamente 2 minutos hasta que el pH se estabilizó, después se agregaron 50 mg de harina de soya recién obtenida y una gota de fenoltaleína, se volvió a dejar estabilizar el pH y se agregó Urea 0.166 F (61 μ L) para tener una concentración en el medio de 1×10^{-3} F. Se tomó la lectura de pH cada minuto. Hasta que se mantuvo estable, lo que ocurrió aproximadamente en 15 minutos.

Se repitió el ensayo con diferentes concentraciones de urea en el medio. Tomando las lecturas de pH a los 15 minutos para cada ensayo se trazaron las gráficas de

Δ pH = f (Log [urea]), es decir, las curvas de calibración.

La curva típica de Δ pH = f (Log [urea]) se muestra a continuación. Figura 8. Aquí se observa que conforme el incremento de pH se hace mayor se pierde la linealidad, lo cual se podría atribuir a que la enzima se desactiva por incremento del pH.

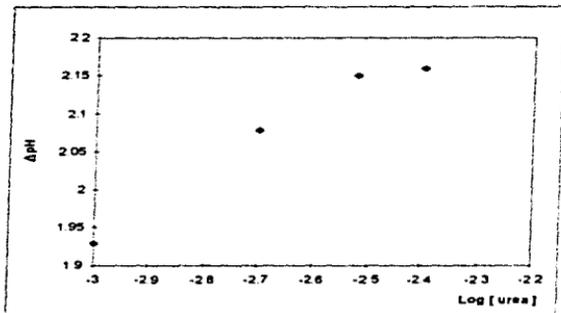


FIGURA 8. Típica curva de calibración de urea usando el sensor POSAI B-3 y hanna de soya en el medio de reacción. $\Delta\text{pH} = f(\text{Log}[\text{urea}])$

3. Construcción del Biosensor

3.1 Montaje

El trozo de elegido acero oxidado, POSAI, se sujetó con resina epóxica dentro de un tubo de plástico de 6 mm de diámetro interior y 10 mm. de longitud, dejando 2 mm. fuera la cara pulida y oxidada

Este conjunto se colocó dentro de un tubo de vidrio de 6 mm. de diámetro interior y 8 cm de longitud, dejando una poza de 2 mm. entre la cara oxidada del acero y el extremo del tubo de vidrio, se fijó con plastilina epóxica para sellar cualquier posible hueco por donde pudiera entrar líquido al cuerpo del sensor y se dejó secar hasta el día siguiente

En la poza que quedaba en el tubo de plástico donde fue fijado inicialmente el acero oxidado POSAI, se colocó una gota de mercurio de aproximadamente 0.5 mL para que sirviera de contacto eléctrico con el conductor, un alambre de cobre, y se selló con plastilina epóxica el extremo superior del tubo de vidrio para que no saliera el mercurio ni se moviera el alambre

En la poza que quedó entre la cara del POSAI y el extremo inferior del tubo de vidrio se colocaron 150 μ L del extracto acuoso de ureasa, se cubrieron con un cuadrado de membrana de diálisis *Spectrapor 1* de 1 cm^2 , este se empujó sobre la cara del POSAI con un anillo de plástico de 6 mm de diámetro exterior y 2 mm. de longitud, hasta tener una capa de extracto enzimático lo más delgada posible, con lo que quedó armado el biosensor

En las figuras 9 a 12 se muestran esquemas de los pasos del montaje del biosensor.

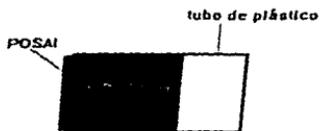


FIGURA 9 POSAI dentro del tubo de plástico

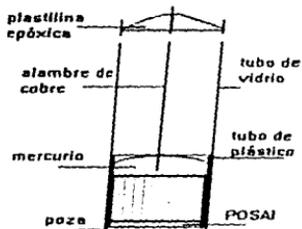


FIGURA 10 Sensor de POSAI armado
 POSAI dentro del tubo de plástico que se encuentra
 dentro de un tubo de vidrio y está conectado al
 conductor de cobre mediante una gota de mercurio

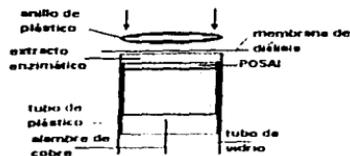


FIGURA 11 Montaje del biosensor
El extracto enzimático se colocó dentro de la poza, se cubrió con una membrana de diálisis que se ajustó al tubo de vidrio con un anillo de plástico

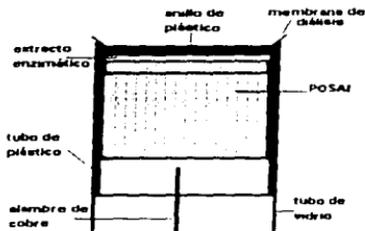


FIGURA 12 Biosensor armado
Al empujar el anillo de plástico sobre la membrana de diálisis se obtiene una capa delgada de extracto dentro de la poza

Para comprobar que el extracto enzimático permanecía dentro del sensor se dejó en 1 mL de medio salino, en refrigeración, durante la noche y al día siguiente se agregó al medio 50 μ L de urea 0.166 F, y una gota de fenolftaleína al 1 % para corroborar que no ocurriera alcalinización del medio.

Se encontró que en ocasiones, si el anillo plástico no estaba bien colocado, el extracto salía del sensor, de allí que es importante que dicho anillo ajuste muy bien.

3.2 Curvas de Actividad $\text{pH} = f(t)$ para diferentes concentraciones de urea en el medio

Se intentó abarcar un intervalo de concentraciones de urea en el medio de reacción desde 10^2 F hasta 10^4 F pero se encontró que el biosensor construido no es capaz de detectar concentraciones menores a 10^{-4} F y pierde la linealidad de la respuesta con concentraciones superiores a 3×10^{-3} F. Las curvas típicas correspondientes a este ensayo se muestran en las figuras 13 y 14.

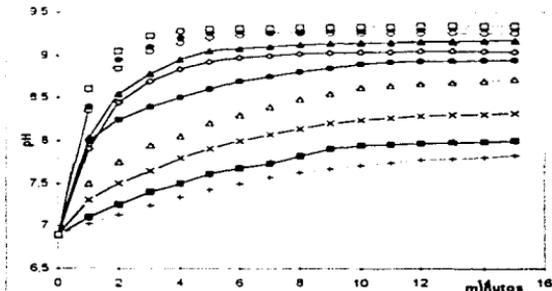


FIGURA 13. Curvas de actividad $\text{pH} = f(t)$ para un intervalo de concentraciones de urea de $10^{-3.78}$ M a $10^{-1.82}$ M.

+ $10^{-3.78}$ M ■ $10^{-1.82}$ M X $10^{-2.1}$ M Δ $10^{-2.78}$ M
 ● $10^{-2.46}$ M ◊ $10^{-2.32}$ M ▲ $10^{-2.1}$ M ○ $10^{-1.82}$ M
 ◆ $10^{-1.96}$ M □ $10^{-1.3}$ M

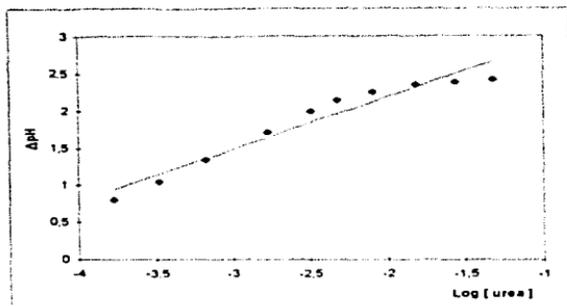


FIGURA 14. Curva de calibración de urea en un intervalo de concentración de 10^{-4} M a 10^{-1} M sin cambiar extracto enzimático ($\Delta\text{pH} = f(\text{Log [urea]})$)

Se fue reduciendo el intervalo de concentraciones ensayado para las curvas de actividad $\text{pH} = f(t)$ y curvas de calibración $\Delta\text{pH} = f(\text{Log [urea]})$ hasta uno que abarca de $10^{-3.87}$ M hasta $10^{-3.18}$ M, pues los valores de urea que podrán encontrarse al diluir la muestra de suero en el medio de reacción pertenecen a ese intervalo

Luego se trazaron las curvas $\text{pH} = f(t)$ correspondientes. Estas curvas se realizaron sin cambiar el extracto enzimático entre un ensayo y otro pero el tiempo de lavado del sensor para que recuperara el pH inicial entre ensayos fue de 10 a 90 minutos, se necesitó mayor tiempo cuanto mayor pH se alcanzaba durante el ensayo. En las figuras 15 a 17 se muestran ejemplos de las curvas de actividad $\text{pH} = f(t)$ correspondientes a estos ensayos

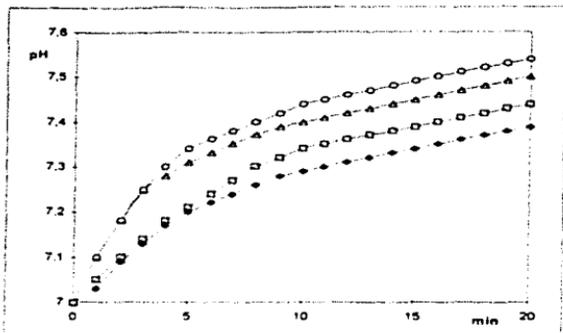


FIGURA 15 Curvas de actividad $\text{pH} = f(t)$ con el sensor B-3 Sin cambiar extracto enzimático entre ensayos para las siguientes concentraciones de urea
 \blacklozenge $10^{-1} M$ \square $10^{-2} M$ \triangle $10^{-3} M$ \circ $10^{-9} M$

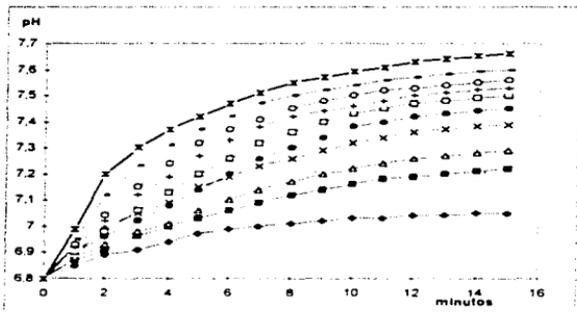


FIGURA 16 Curvas de actividad $\text{pH} = f(t)$ con el sensor B-3 sin cambiar el extracto enzimático entre ensayos Para las siguientes concentraciones de urea
 \blacklozenge $10^{-1} M$ \blacksquare $10^{-17} M$ \triangle $10^{-33} M$ \bullet $10^{-26} M$ \bullet $10^{-32} M$ \bullet $10^{-34} M$ \bullet $10^{-44} M$ \bullet $10^{-60} M$ \bullet $10^{-16} M$ \bullet $10^{-30} M$

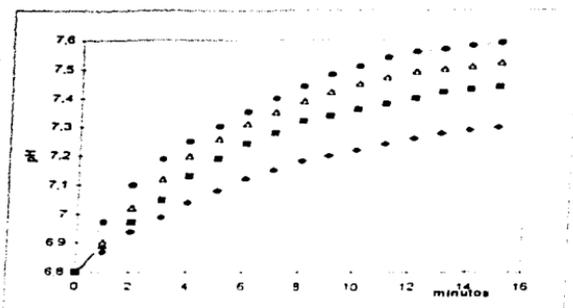


FIGURA 17. Curvas de actividad $pH = f(t)$ con el sensor B-3 sin cambiar el extracto enzimático entre ensayos para las siguientes concentraciones de urea: \blacklozenge $10^{-3} M$ \blacksquare $10^{-4} M$ \blacktriangle $10^{-5} M$ \bullet $10^{-6} M$

3.3 Curvas de Calibración Sin Renovación del Extracto Enzimático.

Como se ve en las curvas de actividad $pH = f(t)$, aproximadamente a los 10 minutos se alcanza un estado estacionario en el cambio de pH respecto al tiempo, de modo que tomando los incrementos de pH correspondientes a 10 minutos de reacción, se trazaron las correspondientes gráficas de $\Delta pH = f(\text{Log}[\text{urea}])$, es decir, curvas de calibración de urea

Las curvas típicas obtenidas se muestran en las figuras 18 a 20

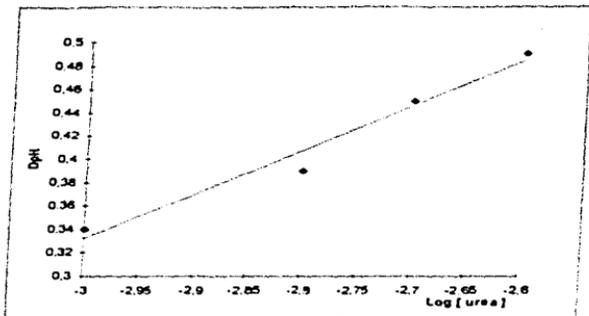


FIGURA 18 2ª Curva de calibración de urea con el sensor POSAI B-3 sin cambiar extracto enzimático entre ensayos $\Delta pH = f(\text{Log [urea]})$ $r = 0.9930$

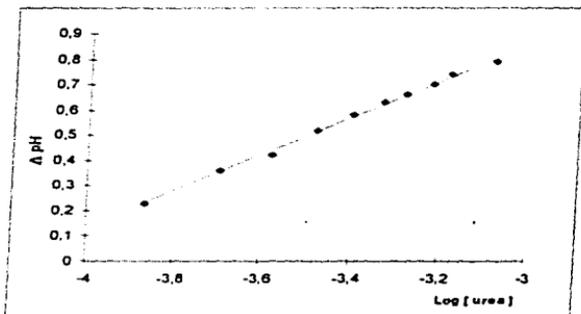


FIGURA 19 4ª Curva de calibración de urea con el sensor B-3 sin cambiar el extracto enzimático entre ensayos $\Delta pH = f(\text{Log [urea]})$ $r = 0.9984$

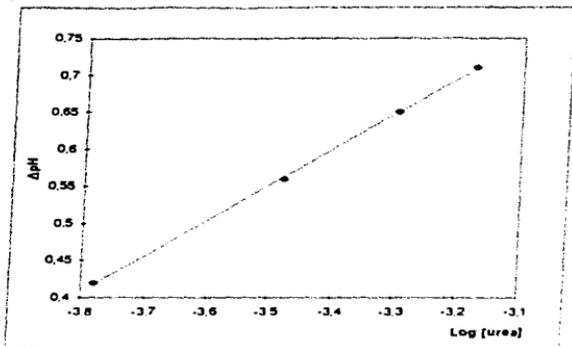


FIGURA 20 6ª Curva de calibración de urea con el sensor B-3 sin cambiar el extracto enzimático entre ensayos $\Delta pH = f(\text{Log}[\text{urea}])$ $r = 0.9998$

3.4 Curvas de Calibración con Renovación del Extracto Enzimático

Posteriormente se encontró que si se cambiaba el extracto enzimático entre ensayos el tiempo requerido para estabilizar el pH inicial era menor, en promedio 5 minutos, por lo que se decidió repetir las curvas de calibración cambiando la capa de extracto entre ensayos.

Una típica curva de actividad $\text{pH} = f(t)$ se muestra en la figura 21.

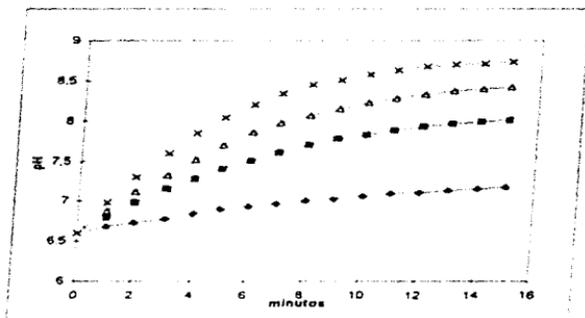


FIGURA 21 Curvas de actividad $\text{pH} = f(t)$ con el sensor POSAL B-3 Cambiando el extracto enzimático entre ensayos, para las siguientes concentraciones de urea.

● 10^{-17} M ■ 10^{-16} M × 10^{-15} M △ 10^{-14} M

Se hicieron 20 curvas de calibración cambiando el extracto enzimático entre determinaciones, algunas de las cuales se muestran en las figuras 22 a 25. Estas curvas sirvieron también para realizar los ensayos en muestras de suero.

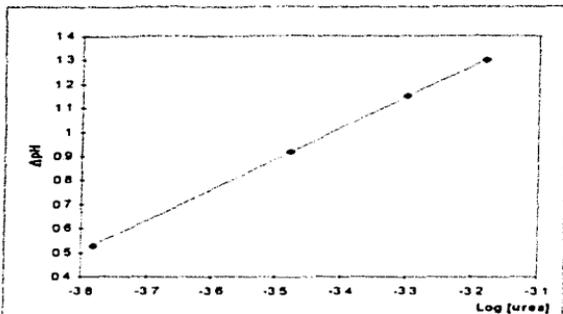


FIGURA 21 Curva de calibración de urea # 12 con el sensor POSAI B-3 cambiando el extracto enzimático entre ensayos $\Delta pH = f(\text{Log}[\text{urea}])$
 Ecuación de la recta $\Delta pH = (5.39 \pm 0.02) + (1.28 \pm 0.01) (\text{Log}[\text{urea}])$ $r = 0.9999$

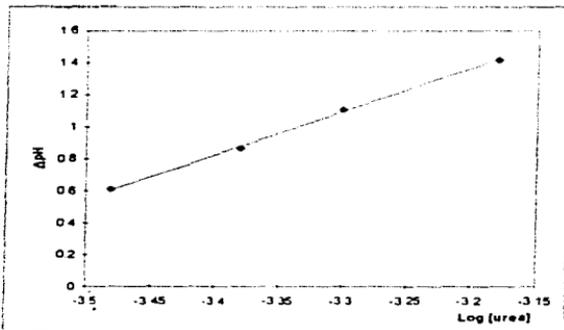


FIGURA 22 Curva de calibración de urea # 14 con el sensor POSAI B-3 cambiando el extracto enzimático entre ensayos $\Delta pH = f(\text{Log}[\text{urea}])$
 Ecuación de la recta $\Delta pH = (10.07 \pm 0.18) + (2.72 \pm 0.05) (\text{Log}[\text{urea}])$ $r = 0.9996$

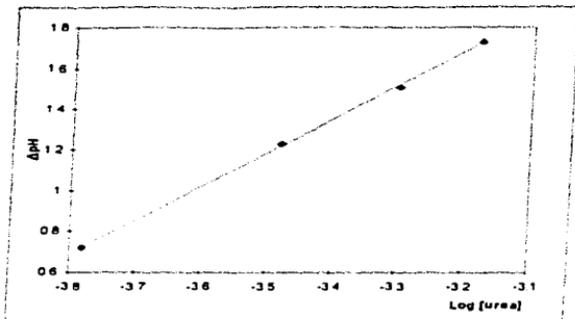


FIGURA 23 Curva de calibración de urea # 18 con el sensor POSAI B-3 cambiando el extracto enzimático entre ensayos. $\Delta pH = f(\text{Log}[\text{urea}])$
Ecuación de la recta $\Delta pH = (7.04 \pm 0.09) + (1.67 \pm 0.03) (\text{Log}[\text{urea}])$ $r = 0.9997$

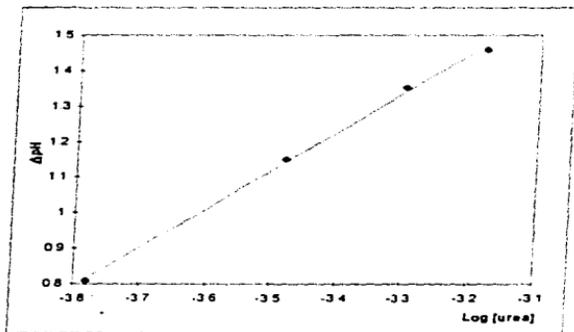


FIGURA 24 Curva de calibración de urea # 19 con el sensor POSAI B-3 cambiando el extracto enzimático entre ensayos. $\Delta pH = f(\text{Log}[\text{urea}])$
Ecuación de la recta $\Delta pH = (4.95 \pm 0.09) + (1.09 \pm 0.03) (\text{Log}[\text{urea}])$ $r = 0.9994$

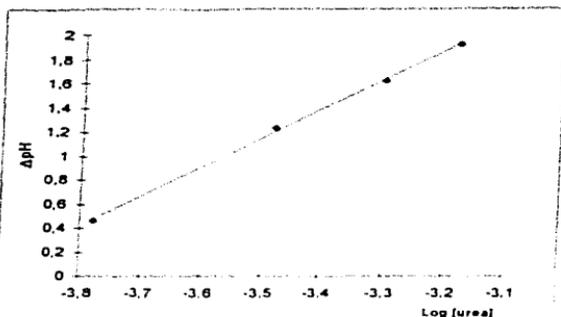


FIGURA 25 Curva de calibración de urea # 20 con el sensor POSAI B-3 cambiando el extracto enzimático entre ensayos. $\Delta pH = f(\text{Log [urea]})$
 Ecuación de la recta $\Delta pH = (0,62 \pm 0,2) + (2,42 \pm 0,05)(\text{Log [urea]})$ $r = 0,9994$

4.0 Determinación de Urea en Muestras de Suero Humano.

Después de hacer los ensayos necesarios para obtener la curva de calibración correspondiente al trabajo del día se colocó el biosensor en 5 mL de medio salino y se dejó estabilizar el pH inicial. Luego se agregó una alícuota de suero humano de 125 μL , 150 μL ó 250 μL , dependiendo del volumen disponible de muestra y se tomó la lectura de pH cada minuto hasta un tiempo total de 15 minutos. Se probó con volúmenes de muestra diferentes en las primeras determinaciones y se vio que es suficiente una alícuota de 150 μL para que la determinación se lleve a cabo bien y para que los valores obtenidos de urea en el medio de reacción se encuentren dentro del intervalo de concentraciones de las curvas de calibración. Cada muestra de suero se ensayó 4 veces el mismo día.

Los ΔpH obtenidos para un tiempo de 10 minutos se interpolaron en la curva de calibración correspondiente para obtener la concentración de urea en el medio de reacción. Teniendo en cuenta la dilución de la muestra en el medio se hicieron los cálculos correspondientes para tener el valor de la concentración de urea en suero para cada determinación

5. Comparación del Método Electroquímico con el Método Espectrofotométrico Habitual de la Diacetilmonoxima.

Uno de los métodos más frecuentemente usados en los laboratorios clínicos para determinar urea es el de la Diacetilmonoxima (DAM) debido a que no es tan costoso como los métodos espectrofotométricos que utilizan ureasa purificada y U V , aunque no es tan específico como estos. Los valores de referencia reportados en la literatura para este método son mayores que los reportados para métodos más específicos como el método espectrofotométrico de U V que emplea ureasa purificada y glutamato-deshidrogenasa

Valores de referencia

Método espectrofotométrico enzimático 1.8 a 6.1 mmol / litro

Método de la DAM 2.9 a 9.4 mmol / litro "Kaplan, Lawrence A. (1984)"

Cada muestra de suero se ensayó por cuadruplicado siguiendo este método y usando un espectrofotómetro *Spectronic 20 de Bauch & Lomb*. Se encontró que los resultados obtenidos por ambos métodos (electroquímico y espectrofotométrico de la DAM) no muestran diferencias que sean clínicamente significativas

Los resultados obtenidos por ambos métodos se muestran en la tabla 1

Con objeto de saber si los resultados obtenidos con ambos métodos no muestran diferencias estadísticamente significativas se aplicó una prueba de significación (*Hipótesis Nula*) para determinar si el promedio de los resultados obtenidos con ambos métodos es el mismo, con un grado de significación del 5 %. Los resultados de dicha prueba muestran que si hay diferencias estadísticamente significativas, es decir, no se obtiene el mismo resultado con los dos métodos, lo cual puede ser debido a que el método de la DAM es menos específico y por lo tanto hay errores sistemáticos

Se utilizó este método para comparar resultados porque era el que estaba al alcance de las posibilidades del laboratorio

El principio y la descripción del método de la DAM se tratan en el anexo III.

TABLA # 1

Resultados obtenidos para las muestras de suero con el biosensor construido y con el método de la diacetilmonoxima (DAM)

número de muestra	número de curva	DpH	alico ta de suero (mL)	volum en de medio (mL)	[urea] en suero (mM) sensor	absor bancia patrón	absor bancia muestra	[urea] en suero (mM) DAM	[urea] promedio muestra	desviación estándar
5a	12	1 11	0 250	5	9 516	0 46	0 44	9 565	biosensor	biosensor
5b	12	1 10	0 250	5	9 346	0 46	0 435	9 456	9 52	0 14
5c	12	1 12	0 250	5	9 689	0 46	0 44	9 565	DAM	DAM
5d	12	1 11	0 250	5	9 516	0 46	0 43	9 348	9 48	0 104
7a	14	0 91	0 250	5	9 007	0 425	0 44	10 353	biosensor	biosensor
7b	14	0 90	0 250	5	8 931	0 425	0 435	10 235	9 01	0 062
7c	14	0 92	0 250	5	9 083	0 425	4 44	10 353	DAM	DAM
7d	14	0 91	0 250	5	9 007	0 425	4 44	10 353	10 32	0 059
11a	18	0 55	0 125	5	5 328	0 48	0 29	6 041	biosensor	biosensor
11b	18	0 55	0 125	5	5 328	0 48	0 29	6 041	5 33	0 059
11c	18	0 54	0 125	5	5 255	0 48	0 30	6 25	DAM	DAM
11d	18	0 56	0 125	5	5 401	0 48	0 30	6 25	6 15	0 121
12a	19	0 57	0 150	5	3 291	0 47	0 19	4 043	biosensor	biosensor
12b	19	0 55	0 150	5	3 155	0 47	0 185	3 936	3 24	0 065
12c	19	0 57	0 150	5	3 291	0 47	0 19	4 043	DAM	DAM
12d	19	0 56	0 150	5	3 225	0 47	0 195	4 149	4 04	0 087
13a	20	0 87	0 150	5	8 318	0 455	0 46	10 109	biosensor	biosensor
13b	20	0 88	0 150	5	8 397	0 455	0 46	10 109	8 34	0 076
13c	20	0 88	0 150	5	8 397	0 455	0 465	10 219	DAM	DAM
13d	20	0 86	0 150	5	8 239	0 455	0 46	10 109	10 140	0 055

CAPÍTULO III

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Con base en las gráficas de los ensayos de la actividad de ureasa en la harina de soya, se puede decir que el sensor de acero oxidado, POSAI, es capaz de monitorear los cambios de pH debidos a la hidrólisis de urea catalizada por la ureasa de una manera muy semejante a como lo hace el electrodo de vidrio

Cuando se trató de oxidar el acero tipo 316 en las condiciones reportadas en la literatura se obtuvieron los resultados esperados, las POSAI no lograron calibrarse con amortiguadores y no se formó bien la película de óxidos a simple vista

No se contó con la tecnología necesaria para medir el grosor de la película de óxidos formada a cada tiempo de oxidación y así tener una del grosor recomendado en la literatura como óptimo. Debido a esto se decidió usar las que pudieron calibrarse más fácilmente y presentaron tiempos de respuesta menores

Se encontró que después de haber reposado en agua las películas de óxidos respondieron más fácilmente a los cambios de pH y las lecturas se hicieron estables por completo. Probablemente esto se debe a que el equilibrio entre la POSAI y el medio acuoso se establece lentamente

Posteriormente se comprobó que las películas de óxidos pudieran monitorear valoraciones ácido-base en agua destilada, aunque no todas las POSAI obtenidas lo hicieron con la misma eficiencia, las eficiencias que mostraron no siempre fueron

superiores al 90 %, de modo que el trabajo se continuó con las que presentaron mayor eficiencia.

Después de realizar valoraciones ácido-base en presencia de los iones Cl^- , Na^+ y K^+ para comprobar que la eficiencia no era disminuida ni la respuesta del sensor era alterada por la presencia de estos iones en el medio, se puede proponer a las películas de óxidos sobre acero inoxidable como transductores para biosensores, ya que pueden monitorear satisfactoriamente los cambios de pH en fluidos biológicos y medios semejantes

Se demostró también que las POSAI pudieron monitorear los cambios de pH respecto al tiempo, colocando la enzima en el medio de reacción con diferentes concentraciones de urea se pudieron trazar curvas de calibración $\Delta\text{pH} = f(\text{Log}[\text{urea}])$, aunque al alcanzar un cierto pH (mayor a 8.5) ya no puede continuar la reacción, pues la enzima se desactiva en esas condiciones, así que el intervalo de concentraciones de urea no puede ser muy amplio

Se probó la actividad de ureasa en el extracto crudo acuoso de soya usando pequeñas cantidades del mismo (5 - 100 microlitros) contra concentraciones de urea relativamente grandes(1.5×10^{-2} F) Se encontró que bastaba una pequeña cantidad de extracto (a partir de 10 microlitros) para catalizar la hidrólisis de la urea al máximo, antes de desactivarse por el incremento del pH de modo que a falta de la enzima purificada este extracto puede ser un buen sustituto

Con el extracto enzimático en el sensor se trató de cubrir un intervalo de concentraciones de urea desde 10^{-2} hasta 10^{-4} F, pero las curvas de actividad

$\text{pH} = f(t)$ mostraron que no era posible pues a concentraciones superiores a 3×10^{-3} F las curvas se van encimando y se pierde la linealidad de la respuesta. además, cuando la concentración de urea en el medio era menor a 10^{-4} F el sensor no mostraba ningún cambio de pH, de modo que se estableció trabajar con intervalos de concentración de urea desde 1.5×10^{-4} hasta 10^{-3} F

Primero se trabajó sin cambiar la capa de extracto enzimático en el sensor, pero los tiempos de lavado entre una y otra determinación para que el sensor regresara al pH inicial en el medio de reacción eran muy largos a veces superiores a una hora, lo que hacía el trabajo muy lento lo cual impediría realizarlo durante las sesiones de prácticas en los cursos de Química Analítica Instrumental

Se encontró que si se lavaba el sensor con agua y se cambiaba la capa de extracto enzimático entre las determinaciones el tiempo requerido para que el sensor se estabilizara en el pH inicial es de unos 10 minutos en promedio, lo que representa una ventaja

Existía la preocupación de si se perdía o no extracto enzimático durante las determinaciones o durante los lavados. Con este fin se realizaron ensayos para comprobar que la enzima no se perdía, los cuales mostraron que en ocasiones el anillo de plástico que sostenía a la membrana de diálisis no quedaba bien colocado y sí podía perderse enzima. Es necesario tener en cuenta que el anillo de plástico no estaba adaptado exactamente al tubo de vidrio porque no fue cortado o moldeado con instrumentos de precisión de modo que si no entraba en la posición correcta podía quedar flojo o podía romper a la membrana de diálisis, así que este paso del armado del sensor es muy importante

Las curvas de calibración que se obtuvieron al cambiar la capa de extracto enzimático mostraron por lo general un coeficiente de correlación mayor, tal vez debido a que no se alcanzaba a desactivar la enzima por los incrementos de pH durante los ensayos

Al trabajar con muestras de suero humano se encontró que al repetir el ensayo para la misma muestra varias veces se obtienen resultados semejantes, su desviación estándar es pequeña, es decir, que el método presenta una buena precisión .

Al comparar los resultados obtenidos en la determinación de urea con el biosensor construido para cada muestra de suero, con los resultados obtenidos para las mismas muestras usando el método espectrofotométrico de la diacetilmonoxima, se encontró que los resultados obtenidos con el método espectrofotométrico generalmente eran más altos que los obtenidos con el biosensor. Probablemente esto se debe a que el método espectrofotométrico no es muy específico, por lo que hay errores sistemáticos involucrados en las determinaciones

En conclusión

Es posible proponer el uso de las películas de óxidos sobre acero inoxidable, POSAI, como transductores para biosensores

Se logró obtener un biosensor selectivo a urea económico, que incluso puede construirse fácilmente durante las sesiones de prácticas de Química Analítica Instrumental

La metodología que se utilizó para realizar las determinaciones en suero humano se podría aplicar en una práctica de laboratorio

Es posible miniaturizar el sensor usando una POSAI formada sobre un alambre de acero en lugar de una barra, aún cuando habría que emplear otra forma de inmovilizar a la enzima

Podría probarse el uso de enzima purificada comercial en lugar del extracto para ver si es posible abarcar un intervalo de concentraciones mayor

Si se desea usar este método en el laboratorio clínico se recomienda hacer determinaciones en sueros control para conocer la exactitud del método o comparar resultados con los que se obtuvieran mediante el método espectrofotométrico enzimático

ANEXO I

EJEMPLO DE REGRESION LINEAL Obtenida con el programa EXCEL 5 de Microsoft Office

Valoraciones ácido-base para probar el sensor POSAI B-3

2ª Valoración de 300 mL de HNO₃ 0.1 F con NaOH 0.1520 M en 5 mL de agua destilada



Lecturas obtenidas	
pH	mV
2.72	253
2.73	252
2.8	250
2.93	241
3.1	230
3.8	190
5.6	85
8.3	-70
8.98	-112
9.4	-138

REGRESION LINEAL

RESUMEN

Estadísticas de la regresión

Coefficiente de correlación múltiple 0.999976506

Coefficiente de determinación R² 0.999953013

R² ajustado 0.99994714

Error típico 1.190553856

Observaciones 10

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad		Suma de cuadrados
Regresión	1	241319	5607
Residuos	8	11.33934787	
Total	9	241330	9
	Coeficientes		Error típico
Intercepción	411.7730153	0.805173934	
Variable X 1	-58.31473696	0.141328941	

ANÁLISIS DE LOS RESIDUALES

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	253.1589358	-0.158930789
2	252.5737834	-0.573783419
3	248.4917518	1.508248168
4	240.910836	0.089183972
5	230.9973307	-0.997330746
6	190.1770149	-0.177014877
7	85.21048836	-0.210488357
8	-72.23930142	2.239301423
9	-111.8933226	-0.106677448
10	-136.3855121	-1.614487926

Interpretación y uso de los datos proporcionados por el programa.

Correlación

Se usa para estimar si los datos experimentales se ajustan bien a una línea recta.

El coeficiente de correlación múltiple junto con la gráfica de calibración son suficientes para asegurar que hay una relación lineal

Cuando los valores del coeficiente de correlación son menores a 0.90 es necesario usar una prueba para saber si dicho coeficiente es significativo, considerando el número de pares de valores usados en su cálculo, en ese caso el método más simple es calcular un valor de t que se compara con el tabulado al nivel de significación deseado usando una prueba de t de dos colas y $(n - 2)$ grados de libertad. La hipótesis nula en este caso es que no existe correlación entre X y Y

Si el valor de t calculado es mayor que el tabulado se concluye que sí existe una correlación significativa

Regresión

Suponiendo que existe una relación lineal entre la señal analítica (Y) y la concentración (X), se puede calcular la "mejor recta" a través de los puntos de la gráfica de calibración, cada uno de los cuales está sujeto a un error experimental. Suponiendo que los errores se encuentren sobre Y

Es necesario buscar la recta que minimice las desviaciones en dirección de Y , entre los puntos experimentales y la línea calculada. Estas desviaciones se conocen como residuos de Y . Unas serán positivas y otras negativas

Se intenta minimizar la suma de los cuadrados de los residuos con base en el principio de que la línea debe pasar por el "centro de gravedad" de los puntos (X, Y)

Se obtiene también el error típico para la pendiente y la ordenada al origen.

Con esto se puede obtener el límite de confianza para la pendiente y la ordenada al origen

Para la pendiente (variable X_1) Límite de confianza = Coeficiente \pm error típico

Para la ordenada al origen Límite de confianza = Coeficiente \pm error típico
"Miller and Miller (1993)"

ANEXO II

Cálculos para obtener la eficiencia del sensor de POSAI

Fundamento y Aplicación.

El cambio en milivoltios que presenta el sensor a la variación unitaria de pH durante la calibración con amortiguadores o durante una valoración ácido-base, corresponde a la pendiente experimental de dicho sensor. Para caracterizar la desviación de la respuesta del sensor en relación a la respuesta teórica de Nernst, representada por el electrodo de hidrógeno, se utiliza el coeficiente β "Ultra Ion, manual del usuario", el cual se define como

$$\beta = 100 \times (P / N)$$

Donde N es la pendiente teórica de Nernst que presenta el electrodo de hidrógeno a la temperatura de trabajo y cuyos valores se indican en la tabla A.

T °C	mV / pH	T °C	mV / pH
0	54.2	30	60.1
10	55.2	40	62.1
20	57.8	60	66.1
25	59.2	100	74.0

Tabla A. Pendientes teóricas de Nernst a diferentes temperaturas para el electrodo de hidrógeno

La pendiente experimental (P) para el sensor se puede obtener a partir de los datos de pH y mV registrados durante una valoración ácido-base, trazando la gráfica de $E = f (pH)$ y haciendo los cálculos necesarios. Para tener un valor de pendiente experimental más cercano al real se puede realizar el análisis de regresión lineal correspondiente y tomar el valor que se obtenga para la pendiente.

Es recomendable que los datos que se manejen tengan una correlación de 0.9999 o mayor.

Para obtener el valor de la pendiente teórica de Nernst a la temperatura de trabajo se pueden graficar los valores de la tabla A, y posteriormente interpolar en la gráfica el valor de la temperatura de trabajo.

Una vez obtenidos ambos valores de pendiente, N y P solo es necesario sustituirlos en la ecuación $\beta = 100 \times (p / N)$.

Para fines prácticos no es recomendable usar un electrodo cuya eficiencia es menor al 90 %.

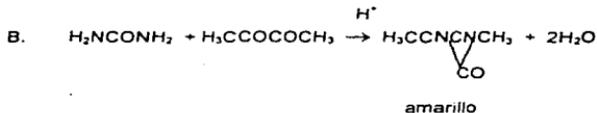
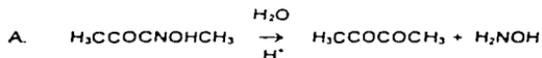
ANEXO III

Método Espectrofotométrico de la Diacetilmonoxima Para Determinar Urea en Fluidos Biológicos

Fundamento

La diacetilmonoxima ($\text{H}_3\text{CCOCNOHCH}_3$) se hidroliza en presencia de ácido, produciendo un derivado de diacetilo que es inestable. Este compuesto de diacetilo reacciona con la urea para producir un derivado colorido de la diazina que se cuantifica por espectrofotometría. el color se intensifica por la adición de tiosemicarbazida

La hidroxilamina liberada, que acompaña a la formación del diacetilo interfiere en la cuantificación y suele eliminarse por medio de agentes oxidantes tales como el sulfato férrico amoniacal o el cloruro férrico



" Kaplan, Lawrence A. (1984)"

Reactivos necesarios

Todos los reactivos empleados deben ser grado R.A.

1. Diacetilmonoxima
2. Tiosemicarbazida
3. Cloruro de sodio
4. Ácido sulfúrico concentrado
5. Ácido fosfórico al 85 % en agua
6. Cloruro férrico
7. Urea

Preparación de reactivos

1. Disolución de diacetilmonoxima:

Se disuelven 0.1 gramos de diacetilmonoxima, 0.02 gramos de tiosemicarbazida y 0.9 gramos de cloruro de sodio en 50 mL de agua destilada y se llevan a un volumen final de 100 mL.

2. Mezcla oxidante:

Se añaden cuidadosamente 6 mL de ácido sulfúrico concentrado y 1 mL de ácido fosfórico al 85 % a unos 80 mL de agua destilada. Luego de mezclar se adiciona 0.01 gramos de cloruro férrico y se lleva a un volumen final de 100 mL.

3. Disolución patrón de urea:

En un matríz aforado de 200 mL se disuelven 0.1202 gramos de urea en unos 100 mL de agua destilada, se agita hasta disolución completa y se lleva al aforo. Esta disolución corresponde a una concentración 10 mM de urea.

Procedimiento

Lo más adecuado es realizar la determinación directa en suero pero si se ha obtenido un filtrado libre de proteínas con otros fines, se puede utilizar

En 3 tubos de ensayo (blanco, patrón y problema) se colocan 3 mL de los reactivos 1 y 2.

Al tubo denominado blanco se le agregan 50 microlitros de agua destilada.

Al tubo denominado patrón se le agregan 50 microlitros de disolución patrón de urea de concentración 10 mM

Al tubo denominado problema se le agregan 50 microlitros de suero recién obtenido.

Si se va a usar filtrado libre de proteínas la disolución patrón de urea se diluye 1:10 y en cada uno de los tubos respectivamente se pipetea 0.5 mL de agua destilada, 0.5 mL de disolución patrón diluida y 0.5 mL de filtrado libre de proteínas. Los tubos se calientan en un baño de agua a ebullición durante 15 minutos, se enfrían y el patrón y lá muestra se leen contra el blanco a 520 nm

Cálculos

Debido a que los patrones y muestras se tratan de forma semejante, tenemos que:

$$\frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times \frac{\text{Concentración del patrón}}{\text{Concentración de la muestra}} = \text{Concentración de la muestra}$$

Se recomienda usar al mismo tiempo una disolución patrón de concentración 20 mM y una 10 mM . luego se emplea para los cálculos el patrón cuya absorbancia esté más próxima a la de la muestra "Bauer J. (1986); Kaplan, Lawrens A. (1984)"

Valores de referencia 2.9 a 9.4 mM

ANEXO IV

Prueba de significación para saber si los promedios de dos conjuntos de mediciones son iguales.

Esta aproximación permite saber si las diferencias entre los resultados son significativas o si se pueden justificar por variaciones aleatorias

Teniendo dos medias muestrales (cada conjunto de datos obtenido por un método analítico distinto), tomamos como hipótesis nula que ambos metodos dan el mismo resultado, y necesitamos comprobar que la diferencia de los promedios difiere de cero significativamente "Miller and Miller (1993)"

Si las dos muestras tienen desviaciones estándar que no sean significativamente diferentes es posible calcular una estimación conjunta de la desviación estándar a partir de las dos desviaciones estándar individuales, calculadas como

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad n = \text{número de ensayos.}$$

Para lo cual se usa la ecuación :

$$S^2 = [(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2] / (n_1 + n_2 - 2)$$

Entonces t está dado por:

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{S\sqrt{(1/n_1 + 1/n_2)}}$$

Donde t tiene $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad.

Tomando como ejemplo los datos obtenidos con la curva de calibración # 18 y los obtenidos para la misma muestra con el método de DAM, tenemos que:

	[urea] suero con el biosensor (mM)	[urea] suero por el método DAM
ensayo # 1	5.328	6.041
ensayo # 2	5.328	6.041
ensayo # 3	5.255	6.25
ensayo # 4	5.401	6.25
PROMEDIO	5.328	6.1455
Desviación estándar	0.05960425	0.120666

Para el conjunto de datos

$$S^2 = 9.05575 \times 10^{-3}, \quad S = 0.0951655$$

$t = 6.074$ en un intervalo de confianza del 95%

t tabulado para 6 grados de libertad = 2.45

Como el t calculado es mayor que el tabulado en el intervalo de confianza elegido, se rechaza la hipótesis nula, es decir los dos conjuntos de datos no tienen el mismo promedio y por lo tanto es muy posible que alguno de los métodos presente errores sistemáticos.

1. Anfalt, T., Granelli A. and Jagner D. 1973 *Anal Lett* 6. 969
2. Bauer, J. 1980. Análisis Clínicos Métodos e Interpretación. Ed Reverté Pags. 532 - 533
3. Clark, L C. and Lyons, C 1962. *Ann. N Y Acad Sci* 102, 29
4. Czaban, Jhon D. 1985 "Electrochemical Sensors in a Clinical Chemistry Yesterday, Today, Tomorrow" *Analytical Chemistry* 57. 2. 345A - 356A
5. Durst, R A., de (1969). " Ion Selective Electrodes". Special Publication 314, National Bureau of Standards, Washington D C 1969
6. Frew, Jane E. and Allen Hill H O 1987 "Electrochemical Biosensors" *Analytical Chemistry* 59, 15, 933A - 944A
7. García, F., Pérez, J J y Márquez, S 1997 "Películas de Óxidos Sobre Acero Inoxidable 316 (POSAI 316) Como Electrodo Indicador de pH en Medio No Acuoso" *Rev. Soc. Quim Mex* 41, 3-7
8. Gray, D N., Keyes, M H and Watson, B 1977 "Immobilized Enzymes in Analytical Chemistry". *Analytical Chemistry* 49, 12, 1067A-1078A
9. Guilbault, G G 1976 "Enzyme Electrodes and Solid Surface Fluorescence Methods" *Methods in Enzimology* 44, 579-618
10. Henry, John Bernard. 1994. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio Ediciones Científicas y Técnicas, S.A. Salvat 9° De. Pags. 145-147
11. Kaplan, Lawrence A. Clinical Chemistry Theory, analysis and correlation. 1984. The C.V. Mosby Company.

- 12.** Martínez-Fàvregas, E. and Alegret, S. 1994. " A Practical Approach To Chemical Sensors Through Potentiometric Transducers " *Journal of Chemical Education*. **71**, 3, A67-A70
- 13.** Miller, J.C. y Miller, J.N. 1993. Estadística para Química Analítica 2ª Edición Addison-Wesley Iberoamericana
- 14.** Montalvo, J.G. 1970. *Anal Biochem* **38**, 359
- 15.** Mosbach, K., Nilsson H. and Akerlund A. 1973. *Biochim Biophys Acta* **320**, 529
- 16.** Mosbach, K. 1976. *Methods in Enzimology* **44**, 620
- 17.** Nomura Kiyoshi and Ujihira Yusuke. 1988. " Response of Oxide Films on Stainless Steel as a pH Sensor " *Analytical Chemistry* **60**, 23, 2564 - 2567
- 18.** Rechnitz, G.A. (1967) *Chem Eng News* June 12, 1967. p 146
- 19.** Rechnitz, G.A. 1982. " Bioanalysis with Potentiometric Membrane Electrodes " *Analytical Chemistry*. **54**, 11, 1194A - 1200A
- 20.** Sumner, J.B. 1955. " Urease " *Methods in Enzimology* **2**, 378-37
- 21.** Thompson Michael and Krull, Ulrich J. (1984) " Biosensors and Bioprobes " *Trends in Anal Chem.* 1984, **3**, 7, 173-178
- 22.** Ultra Ion. Electrodo Combinado de Vidrio Manual del Usuario