

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Facultad de Ingeniería

Ingeniería en Nanotecnología



Efecto de la funcionalización de plataformas de carbón nanoestructuradas para
el desarrollo de sensores de urea

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Licenciado en Ingeniería en Nanotecnología.

Presenta:

Oscar Daniel Jiménez Martínez

Dirigido por:

Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa

QUERÉTARO, QRO. 27 de Febrero de 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de
Información



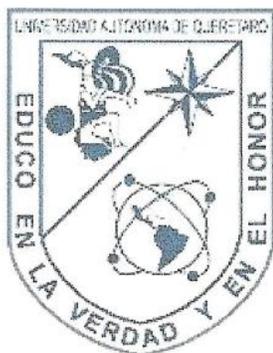
Efecto de la funcionalización de plataformas de carbón
nanoestructuradas para el desarrollo de sensores de
urea

por

Oscar Daniel Jiménez Martínez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

Clave RI: IGLIN-262921-1222-623



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

Especialidad en Ingeniería en Nanotecnología



Efecto de la funcionalización de plataformas de carbón nanoestructuradas para el desarrollo de sensores de urea

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de **Licenciado en Ingeniería en Nanotecnología.**

Presenta:

Oscar Daniel Jiménez Martínez

Dirigido por:

Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa

Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa
Presidente

Dra. Alejandra Álvarez López
Secretario

Dra. Vanessa Vallejo Becerra
Vocal

Dra. Sandra Rivas Gándara
Suplente

Handwritten signature of Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa in blue ink.

Handwritten signature of Dra. Alejandra Álvarez López in blue ink.

Handwritten signature of Dra. Vanessa Vallejo Becerra in blue ink.

Handwritten signature of Dra. Sandra Rivas Gándara in blue ink.

Resumen

El papel de la nanotecnología en el desarrollo de biosensores ha adquirido mucho interés debido a que los avances en la rama de la nanociencia han permitido la integración de especies biológicas y químicas a través de diferentes métodos en el proceso de elaboración de un biosensor.

En el presente trabajo se reporta la formulación y evaluación de diferentes electrodos con uso potencial en biosensores enzimáticos de urea a través de la inmovilización de la enzima ureasa en tres plataformas de carbono nanoestructuradas, nanotubos de carbonos de pared múltiple (MWCNT), carbono vulcan y nanofibras de carbono (CNF); funcionalizadas con nanopartículas de dióxido de iridio (IrO_2NP), cuya síntesis fue conducida por método químico. La estabilidad enzimática en diferentes condiciones de pH y temperatura fue evaluada previo a comenzar a trabajar con los electrodos formulados, el uso de pruebas bioquímicas nos permite conocer los parámetros en los cuáles debemos conducir los experimentos para evitar la desnaturalización de la enzima en cuestión. Por medio de técnicas electroquímicas se estudiaron la estabilidad, reproducibilidad y límite de detección (LOD, por sus siglas en inglés) basándonos en el comportamiento de un electrodo de carbón vítreo recubierto con una tinta catalítica elaborada en base a los electrodos propuestos. Finalmente, se reporta un límite de detección de 0.433 mM de urea en solución.

Palabras clave: biosensor, enzima, ureasa, urea, nanoestructuras de carbono, nanopartículas de Iridio, inmovilización, electroquímica.

Summary

The role of nanotechnology in biosensor development has gained much interest as advances in nanoscience have allowed biological and chemical species to be integrated through different methods into the biosensor development process.

This work reports the formulation and evaluation of different electrodes with potential use in urea enzymatic biosensors through the enzymatic immobilization of the urease enzyme on three nanostructured carbon platforms, multi-wall carbon nanotubes (MWCNT), vulcan carbon and carbon nanofibers (CNF); functionalized with nanoparticles of iridium dioxide (IrO_2NP), the synthesis of which was conducted chemically. The enzymatic stability under different pH and temperature conditions was evaluated before starting to work with the formulated electrodes. The use of biochemical tests allows us to know the parameters in which we should conduct the experiments to avoid the denaturation of the enzyme in question.

Electrochemical techniques were used to study stability, reproducibility and limit of detection (LOD) based on the behavior of a vitreous carbon electrode coated with a catalytic ink made from the proposed electrodes. Finally, a limit of detection (LOD) of 0.433 mM in urea solution was achieved.

Keywords: biosensor, enzyme, urease, urea, carbon nanostructures, nanoparticles, iridium, immobilization, electrochemical.

A mis padres, mi hermana, Laila, mis amigos y a todos aquellos involucrados en el proceso de mi formación académica.

Agradecimientos

La dedicación y consistencia en un trabajo, apoyados por el conocimiento y el esfuerzo, no pueden llegar a una conclusión sin la intervención de personas que no solo nos ayudan a desarrollarlo, sino que también se encuentran presentes en el proceso y ofrecen su apoyo incondicional en todo momento.

Empiezo agradeciendo al Dr. Juan de Dios Galindo, por su paciencia, su conocimiento, su apoyo y su guía. A la Dra. Alejandra Álvarez y al Dr. Aaron Rodríguez por su guía en la evaluación electroquímica y su apoyo con el potencióstato, así como su en la interpretación de los resultados obtenidos. A la Dra. Sandra Rivas y a la Dra. Vanessa Vallejo por abrirme las puertas de sus laboratorios, su asesoría, apoyo, revisión y acompañamiento.

A mis compañeros de carrera y laboratorio, Alan García, Ollin Blanco y Moroni Mora, por su conocimiento, su ejemplo a seguir fue motor para lograr culminar este trabajo.

Finalmente, a mis compañeros en el laboratorio de biosensores y la Universidad Autónoma de Querétaro, gracias por las oportunidades y el apoyo brindado.

Índice General

| | |
|--|----|
| Resumen..... | 3 |
| Summary..... | 4 |
| Índice de tablas..... | 10 |
| Índice de figuras..... | 10 |
| 1. Introducción..... | 14 |
| 2. Planteamiento del problema..... | 16 |
| 3. Justificación..... | 18 |
| | |
| 4. Antecedentes | 20 |
| 4.1 Biosensores..... | 20 |
| 4.1.1 Historia de los biosensores..... | 21 |
| 4.1.2 Fabricación de biosensores..... | 22 |
| 4.2 Sistemas microelectromecánicos de tipo <i>C-MEMS</i> | 24 |
| 4.3 Biosensor enzimático..... | 25 |
| 4.3.1 Biosensores enzimáticos electroquímicos..... | 26 |
| 4.3.2 Enzima | 27 |
| 4.3.3 Inmovilización enzimática | 28 |
| 4.3.3.1 Métodos de inmovilización enzimática..... | 28 |
| 4.3.4 Ureasa | 31 |
| 4.4 Urea | 34 |
| 4.4.1 El ciclo de la urea..... | 35 |
| 4.4.2 Importancia de detección de urea en aplicaciones biomédicas..... | 37 |
| 4.4.3 Identificación de urea por sensores electroquímicos..... | 39 |
| 4.5 Soportes para biosensores..... | 41 |
| 4.6 Carbono | 42 |
| 4.6.1 Nanoestructuras de carbono | 43 |
| 4.6.1.1 Nanotubos de carbono..... | 43 |
| 4.6.1.2 Carbono vulcan..... | 44 |
| 4.6.1.3 Nanofibras de carbono..... | 44 |

| | | |
|---------|---|----|
| 4.7 | Funcionalización de plataformas de carbono..... | 45 |
| 4.8 | Nanopartículas de óxidos metálicos..... | 47 |
| 4.8.1 | Nanopartículas de dióxido de iridio..... | 47 |
| 4.9 | Electrodos autoalimentables y dispositivos microfluídicos..... | 48 |
| | | |
| 5. | Hipótesis y Objetivos..... | 51 |
| 5.1 | Hipótesis..... | 51 |
| 5.2 | Objetivos | 51 |
| 5.2.1 | Objetivo general..... | 51 |
| 5.2.2 | Objetivos específicos..... | 51 |
| | | |
| 6. | Metodología..... | 52 |
| 6.1 | Síntesis de nanopartículas de dióxido de iridio..... | 52 |
| 6.1.1 | Nanopartículas de iridio sin soporte..... | 53 |
| 6.2 | Funcionalización de plataformas de carbón | 53 |
| 6.2.1 | Nanopartículas de iridio soportadas en plataformas de carbón..... | 53 |
| 6.3 | Caracterización fisicoquímica | 53 |
| 6.3.1 | Microscopía electrónica de Barrido (SEM)..... | 53 |
| 6.3.2 | Difracción de Rayos X (XRD)..... | 54 |
| 6.4 | Inmovilización enzimática..... | 54 |
| 6.4.1 | Preparación de tintas catalíticas | 54 |
| 6.4.2 | Prueba de acoplamiento enzimático..... | 55 |
| 6.4.3 | Ciclos de reúso..... | 56 |
| 6.5 | Evaluación del efecto de la inmovilización | 57 |
| 6.5.1 | Efecto de pH y temperatura sobre la actividad catalítica..... | 57 |
| 6.5.1.1 | Ensayo de actividad de ureasa | 58 |
| 6.6 | Caracterización electroquímica | 58 |
| 6.6.1 | Pruebas electroquímicas sobre actividad catalítica..... | 58 |
| 6.7 | Pruebas en celda de combustible..... | 59 |

| | |
|---|-----|
| 7. Resultados y discusión..... | 61 |
| 7.1 Pruebas de Caracterización..... | 61 |
| 7.1.1 Microscopía electrónica de Barrido (SEM)..... | 61 |
| 7.1.2 Difracción de Rayos X (XRD)..... | 66 |
| 7.2 Evaluación enzimática..... | 71 |
| 7.2.1 Ensayo de actividad de la ureasa..... | 71 |
| 7.2.2 Acoplamiento enzimático..... | 73 |
| 7.2.3 Ciclos de reúso..... | 74 |
| 7.3 Pruebas electroquímicas de detección de actividad enzimática..... | 75 |
| 7.3.1 Sistema MWCNT / IrO ₂ NP's..... | 78 |
| 7.3.2 Sistema CNF / IrO ₂ NP's..... | 81 |
| 7.3.3 Sistema Vulcan / IrNP's..... | 84 |
| 7.3.4 Curvas de Calibración..... | 89 |
| 7.4 Pruebas en Celda de Combustible..... | 92 |
| 7.4.1 Cronoamperometría..... | 92 |
| 7.4.2 Curvas de Descarga..... | 93 |
| | |
| 8. Conclusiones..... | 96 |
| 9. Referencias..... | 98 |
| 10. Anexos..... | 106 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Principales propiedades de interés de un biosensor (Slaughter, G., 2006)..... | 24 |
| Tabla 2. Características de los biosensores de urea (Singh et al., 2008)..... | 41 |
| Tabla 3. Datos de la corriente y el potencial utilizados para la elaboración de la curva de calibración, obtenidos con respecto a la concentración de urea..... | 90 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1.1. Escala nanométrica, <i>obtenida de Smart Nanotechnologies.com</i> | 14 |
| Figura 4.1. Diseño típico de un biosensor (Putzbach & Ronkainen, 2013) | 20 |
| Figura 4.2. Principales constituyentes de un biosensor electroquímico fabricado con nanomateriales. (Dridi, F. et al, 2013) | 26 |
| Figura 4.3. Diagramas de moño de la enzima ureasa de diferentes especies bacterianas. A K. aerogenes, B S. pasteurii, C H. pylori y D C. ensimorfis (Mazzei, L. et al, 2020)..... | 33 |
| Figura 4.4. Fórmula estructural de la urea..... | 34 |
| Figura 4.5. Esquema representativo del ciclo de la urea..... | 37 |
| Figura 4.6. Esquema de las reacciones generadas para la identificación de urea a través de la oxidación del amoníaco (NH ₃)..... | 40 |
| Figura 4.7. Esquema de funcionalización de SWCNT con aminas (Andrade Guel, M. L., et al, 2012)..... | 46 |
| Figura 4.8. Diseño de celdas de combustible microfluídicas de forma en Y y forma en I (Castillo-Martínez, L., Dector, A. et al 2020)..... | 49 |
| Figura 6.1. Esquema de la síntesis de nanopartículas de Iridio / Dióxido de Iridio por método químico..... | 52 |
| Figura 6.2. Reactivos y proceso de preparación y homogenización de solución en la preparación de tintas catalíticas..... | 55 |
| Figura 6.3. Esquema del proceso de experimentación para la determinación del acoplamiento enzimático / inmovilización de ureasa sobre el electrodo de carbón funcionalizado con nanopartículas..... | 56 |
| Figura 6.4. Esquema del método de Nessler, utilizado para las pruebas bioquímicas de enzima inmovilizada..... | 57 |
| Figura 6.5. Esquema del diseño y elaboración de una celda de combustible microfluídica basada en papel de un solo canal..... | 59 |
| Figura 7.1. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de las IrO ₂ NP's libres | |

| | |
|--|----|
| sintetizadas por método químico..... | 61 |
| Figura 7.2. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) del sistema MWCNT decorado con IrO ₂ NP's sintetizadas por método químico..... | 62 |
| Figura 7.3. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) del sistema CNF decorado con IrO ₂ NP's sintetizadas por método químico..... | 64 |
| Figura 7.4. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) del sistema Vulcan decorado con IrNP's sintetizadas por método químico..... | 65 |
| Figura 7.5. Difractogramas de rayos X obtenidos de los sistemas sintetizados, comparados con los difractogramas de Iridio (B) y Dióxido de Iridio (D) obtenidos de Materials Project..... | 66 |
| Figura 7.6. Patrones de difracción de rayos X del electrodo Vulcan/IrNP's comparado con el difractograma del Iridio (Materials Project)..... | 67 |
| Figura 7.7. Difractogramas de rayos X del electrodo MWCNT/IrO ₂ NP's comparado con el difractograma de Dióxido de Iridio (Materials Project)..... | 68 |
| Figura 7.8. Patrón de difracción de rayos X de MWCNT's purificados (Atchudan, R., Pandurangan, A., & Joo, J., 2015)..... | 69 |
| Figura 7.9. Difractograma de rayos X del sistema CNF/IrO ₂ NP's sintetizado por método químico..... | 70 |
| Figura 7.10. Difractogramas de referencia de las CNF en función de diferentes temperaturas de síntesis (del Río, D. S., 2011)..... | 70 |
| Figura 7.11. Estabilidad de enzima ureasa libre a diferente pH y temperatura, obtenida a través de un ensayo de estándar de amonio. Estabilidad enzimática en diferentes condiciones A) Condición de temperatura y B) Condición de p.H..... | 72 |
| Figura 7.12. Resultados de inmovilización enzimática. Curvas de acoplamiento de enzima ureasa sobre las diferentes plataformas de carbón nanoestructuradas funcionalizadas con IrO ₂ NP's..... | 73 |
| Figura 7.13. Ciclos de reuso de los electrodos enzimáticos, evaluando la actividad residual de la enzima ureasa en un lapso de 10 días..... | 74 |
| Figura 7.14. Voltametría cíclica (CV) del electrodo propuesto de nanotubos de carbono de pared múltiple decorado con IrO ₂ NP's y ureasa inmovilizada en una solución de urea 10 mM graduada con tampón pH 7.0 contra una curva de control de carbono vítreo y el material sin inmovilización enzimática..... | 75 |
| Figura 7.15. Voltametría cíclica (CV) del electrodo propuesto de nanofibras de carbono decorado con IrO ₂ NP's y ureasa inmovilizada en una solución de urea 10 mM graduada con tampón pH 7.0 contra una curva de control de carbono vítreo y el material sin inmovilización enzimática..... | 76 |

| | |
|--|----|
| Figura 7.16. Voltametría cíclica (CV) del electrodo propuesto de carbón vulcan decorado con IrNP's y ureasa inmovilizada en una solución de urea 10 mM graduada con tampón pH 7.0 contra una curva de control de carbono vítreo y el material sin inmovilización enzimática..... | 76 |
| Figura 7.17. Voltametrías cíclicas de electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de MWCNT/IrO ₂ NP's para soluciones de urea a diferentes concentraciones, de 1 mM a 100 mM..... | 78 |
| Figura 7.18. Voltametrías cíclicas de electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de MWCNT/IrO ₂ NP's para soluciones de urea a diferentes concentraciones, de 1 mM a 100 mM..... | 79 |
| Figura 7.19. Voltametrías de pulso diferencial de electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de MWCNT/IrO ₂ NP's/ureasa para soluciones de urea a diferentes concentraciones, de 1 mM a 100 mM..... | 80 |
| Figura 7.20. Voltametrías cíclicas de electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de CNF/IrO ₂ NP's para soluciones de urea a diferentes concentraciones, de 1 mM a 90 mM..... | 81 |
| Figura 7.21. Voltametrías cíclicas de electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de CNF/IrO ₂ NP's para soluciones de urea a diferentes concentraciones, de 1 mM a 90 mM..... | 82 |
| Figura 7.22. Voltametrías de pulso diferencial de electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de CNF/IrO ₂ NP's para soluciones de urea a diferentes concentraciones, de 1 mM a 70 mM..... | 83 |
| Figura 7.23. Voltametrías cíclicas de electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de Vulcan/IrNP's para soluciones de urea a diferentes concentraciones, de 1 mM a 100 mM..... | 84 |
| Figura 7.24. Voltametrías cíclicas de electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de Vulcan/IrNP's para soluciones de urea a diferentes concentraciones, de 1 mM a 100 mM..... | 85 |
| Figura 7.25. Voltametrías de pulso diferencial de electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de Vulcan/IrNP's para soluciones de urea a diferentes concentraciones, de 1 mM a 30 mM..... | 86 |
| Figura 7.26. Voltametrías de pulso diferencial de electrodo de carbón vítreo modificado, con línea base modificada..... | 86 |
| Figura 7.27. Voltametrías de pulso diferencial de electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de Vulcan/IrNP's/ureasa para soluciones de urea a diferentes concentraciones, de 50 mM a 80 mM..... | 87 |
| Figura 7.28. Voltametrías de pulso diferencial de electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica Vulcan /IrNP's/ureasa en solución de urea. Diagrama con modificación de línea base.... | 88 |
| Figura 7.29. Voltametría Cíclica de un electrodo de carbón vítreo decorado con tinta catalítica Vulcan/IrO ₂ NP's/ureasa en solución de urea a diferentes concentraciones..... | 89 |
| Figura 7.30. Curvas de calibración creadas a partir del análisis del sistema Vulcan / IrNP's / ureasa | |

| | |
|---|-----|
| con respecto a la: A) Corriente y el B) Potencial..... | 91 |
| Figura 7.31. Cronoamperometría a 1 V en celda de combustible microfluídica para un electrodo Vulcan/IrNP's/ureasa en solución de urea: 1 mM, 10 mM, 30 mM y 64 mM..... | 92 |
| Figura 7.32. Polarización y curva de descarga para celda de combustible microfluídica (de papel) de un electrodo de papel toray con tinta catalítica Vulcan/IrNP's como ánodo en solución de buffer de fosfatos pH 7.0 como combustible..... | 94 |
| Figura 7.33. Polarización y curva de descarga para celda de combustible microfluídica de un electrodo de papel toray con tinta catalítica Vulcan/IrNP's/ureasa como ánodo utilizando diferentes concentraciones de urea como electrolito en un rango de 1 mM a 64 mM a 20 mV/s..... | 94 |
| Figura 11.1. Comparación de resultados en los ensayos enzimáticos bioquímicos de estabilidad de enzima libre a diferente pH..... | 109 |
| Figura 11.2. Solución de IrNP's (Nanopartículas de Iridio) previa al proceso de obtención por secado..... | 109 |
| Figura 11.3. Celda de combustible microfluídica conecta a potencióstato..... | 109 |

1. Introducción

La nanotecnología es la disciplina encargada de la investigación y desarrollo de tecnología a escala molecular, atómica y macromolecular, haciendo uso y a través de la manipulación de estructuras y dispositivos cuya organización funcional más pequeña está en la escala de los nanómetros ($1 \cdot 10^{-9}$ m). Los objetos a esta escala, como las nanopartículas, adquieren nuevas propiedades y funciones que se diferencian de aquellas que se observan en un material en bulto (McNeil, S; 2005). Debido a lo anterior, la nanotecnología es considerada una disciplina de investigación con gran interés, acuñado al aprovechamiento de las propiedades únicas de ensamblajes moleculares y atómicos construidos a escala nanométrica. La habilidad de manipular propiedades físicas, químicas y biológicas ofrece a investigadores la capacidad de diseñar y usar materiales nanoparticulados con diferentes propósitos.

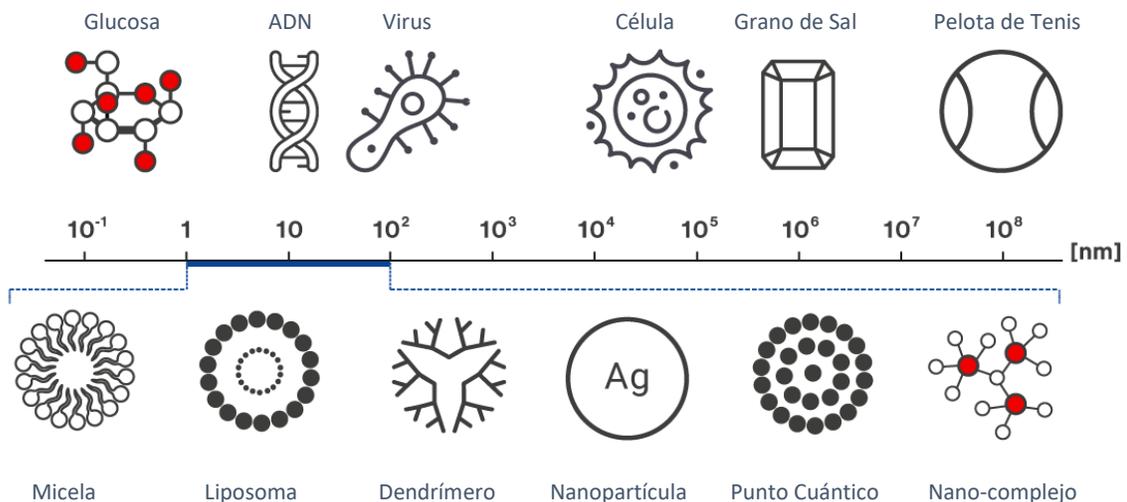


Figura 1.1 Escala nanométrica, obtenida de *Smart Nanotechnologies.com*

En la **Figura 1.1** se aprecia la escala nanométrica entre 1 a 10^2 nm, dentro de la escala podemos encontrar diferentes tipos de estructuras y nanomateriales que han sido usados en aplicaciones biotecnológicas, como son los liposomas, utilizados para sistemas biológicos acarreadores de fármacos que entran al organismo, un poco más a la derecha se observan las

nanopartículas, las cuales pueden tener diferentes tamaños que variarán dependiendo de los métodos de síntesis.

Un área de interés nanotecnológico es el desarrollo de biosensores, ya que ha dibujado un papel vital en la investigación debido a la alta sensibilidad y selectividad en la detección de enfermedades y virus. De particular interés es encontrar materiales adecuados para ser utilizados en la inmovilización de biomoléculas para incrementar su estabilidad y la eficiencia del confinamiento.

Los avances en materiales a micro y nanoescala han permitido la integración de especies biológicas o químicas en dispositivos microelectrónicos con una buena relación costo-beneficio para la producción de *biochips* a escala masiva. En el campo de diagnóstico médico, de acuerdo a Slaughter y colaboradores, los biosensores y biochips siguen jugando un papel muy importante que conduce a resultados clínicos muy positivos, pues promueven el diagnóstico de enfermedades en estado temprano muy rápidamente (Slaughter, G., 2006).

Los elementos incorporados para reconocimiento biológico más comúnmente utilizados incluyen enzimas, anticuerpos, fagos, ADN, ARN, péptidos, fragmentos celulares, tejido y organismos completos; a pesar de todos los elementos biológicos que se han incorporado, los biosensores a base de enzimas han atraído mayor atención (Slaughter, G., 2006), debido a que estas son muy específicas y discriminan entre las especies en el medio sobre el que se ejecuta el análisis.

De manera general, el uso de enzimas favorece la selectividad de un sensor, sin embargo, existen retos para su manipulación y funcionamiento adecuados, debido a que las enzimas pueden sufrir desnaturalización ocasionada por un mal manejo.

En este trabajo se presentan las formulaciones de tres electrodos construidos con plataformas de carbón nanoestructuradas, nanotubos de carbono, carbono vulcan y nanofibras de carbono, todas funcionalizadas con nanopartículas que permitan la inmovilización enzimática de la ureasa, el carbón es un material atractivo debido a que presentan una movilidad electrónica

alta, relación peso-resistencia elevada, estabilidad térmica y flexibilidad. Se emplearon electrodos de carbón caracterizados por su buena área superficial y de fácil fabricación, lo cual favorece la relación costo-beneficio. El efecto de mejorar la inmovilización de una enzima permite disminuir el límite de detección y generar un biosensor de alta sensibilidad, es decir, mejora del rendimiento analítico. Posterior a su formulación, el interés del proyecto radica en evaluar los tres electrodos previamente mencionados e identificar cual es el que posee las mejores propiedades y otorga los mejores resultados, por ende, que tenga un mejor límite de detección y capacidad para la adecuada inmovilización de ureasa por adsorción y/o atrapamiento.

2. Planteamiento del problema

El mecanismo de detección de un biosensor involucra al menos dos componentes esenciales: una plataforma receptiva biológica que interactúe selectivamente con el analito de interés, como lo son las enzimas; y un transductor que convierta la respuesta biológica en una señal de reconocimiento. Sin embargo, las plataformas de carbón carecen de reactividad heterogénea en la superficie que permita la inmovilización de biomoléculas, además, son intrínsecamente hidrofóbicas afectando directamente la polaridad de la superficie, es decir, afinidad por los iones metálicos o la humectabilidad. (B Cardenas-Benitez *et al.*, 2018; Hsieh *et al.*, 2018; Leistenschneider *et al.*, 2018). De tal forma que las plataformas de carbón requieren de un tratamiento previo funcionalización de la superficie antes de inmovilizar las biomoléculas y posteriormente ser utilizadas para el desarrollo de biosensores.

Existen problemas de salud renales que pueden causar malestares o alteraciones corporales ya que a medida que disminuye el número de nefronas, que son las unidades estructurales del riñón responsables de la purificación de la sangre, y se reduce el volumen de filtrado glomerular (VFG) los solutos que son excretados principalmente por filtración glomerular, como la urea y la creatinina, aumentan en sangre (Zotta, E., Ochoa, F., Yeyati, N. L., & Ibarra, C., 2009). Uno de los procedimientos utilizados en la actualidad para la identificación de urea es el método de Berthelot, que corresponde a un ensayo enzimático colorimétrico, en

el cual se identifican los miligramos por decilitro de urea presentes en una muestra de orina diluida mezclada con suero o plasma heparinizado. Se hace uso de un espectrofotómetro el cual proporcionará valores de absorbancia para patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo.

Cálculos usados en el análisis:

$$\frac{(A)\text{Muestra}-(A)\text{Blanco}}{(A)\text{Patrón}-(A)\text{Blanco}} \times 50 (\text{Conc. Patrón}) = \text{mg/dL de urea en la muestra}$$

$$\text{mg/dL Urea} \times 0.466 = \text{mg/dL de Urea BUN (Blood Urea Nitrogen)}$$

El método posee un límite de detección de 0.001 mg/dL.

El aumento de urea en la sangre también puede ser analizado a través de su sensado, el uso de enzimas aumenta la especificidad al momento de llevar al cabo dicho análisis, pues discrimina entre todos los demás componentes que se puedan encontrar en la sangre, permitiendo encontrar únicamente la urea, sin embargo, las enzimas son en extremo sensibles a cambios fisiológicos.

Aunado a lo anterior, es importante encontrar un soporte adecuado para inmovilización enzimática debido a que el uso de una técnica de inmovilización apropiada en el biosensor otorga estabilidad a la enzima, mejora su actividad, selectividad específica, resistencia a inhibidores y, en algunos casos, la purifica. La superficie para la inmovilización del bioreceptor debe tener ciertas propiedades que le permitan interactuar con la enzima sin cambiar su actividad de manera significativa, como lo son estabilidad y/o resistencia mecánica y química, superficies hidrofílicas o hidrofóbicas (dependiendo la aplicación), morfología porosa definida y bajo costo (Botewad, S. N. *et al*, 2021).

3. Justificación

Actualmente existe la necesidad de desarrollar biosensores de urea debido al gran número de aplicaciones que contempla su uso, como el análisis ambiental, atención sanitaria y evaluación en industrias alimenticias, por ejemplo, la industria de productos lácteos. La nanotecnología presenta alternativas llamativas para el diseño y evaluación de dichos dispositivos otorgando una relación costo-beneficio positiva, así mismo favorece una alta selectividad y especificidad. Un beneficio que surge a partir del sensado electrónico basado en corriente que es posible leer la señal con el apoyo de aparatos electrónicos externos, eliminando la necesidad del uso de fuentes de excitación que abarquen mucho espacio o puedan ser incómodas, así como omitir el uso de fotodetectores usados en la detección de sistemas ópticos (Sokolov, A. N., Roberts, M. E., & Bao, Z., 2009).

Existe la posibilidad elaborar un biosensor con el uso de la nanotecnología para mejorar la inmovilización de un agente biológico, específicamente, una enzima, tomando en cuenta sus características para lograr una inmovilización correcta, de tal manera que la cantidad de enzima inmovilizada sea suficiente para poder llevar a cabo la identificación del analito con un límite de detección bajo. En este trabajo se propone emplear electrodos de carbón funcionalizados para inmovilizar la enzima ureasa para el desarrollo de biosensores capaces de detectar urea. Para lograrlo se lleva a cabo la evaluación del efecto de la retención de la actividad enzimática, estabilidad y la eficiencia de la detección comparándola entre tres diferentes tipos de nanoestructuras de carbono, siendo nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT), carbono vulcan y nanofibras de carbono (CNF), respectivamente. La eficiencia del biosensor puede ser mejorada propiciando un análisis rápido de la corriente generada por las reacciones llevadas a cabo gracias a los sistemas nanoestructurados incorporados en el electrodo.

La funcionalización de las nanoestructuras de carbono con nanopartículas permite realizar una identificación del subproducto de la reacción de hidrólisis de la urea, las nanopartículas de iridio o dióxido de iridio ($\text{IrO}_2\text{NP}'\text{s}$) son capaces de interactuar con el amoníaco en una reacción de óxido-reducción con el mismo, permitiéndonos no únicamente la inmovilización

del elemento biológico, sino que las nanopartículas forman parte del electrodo (capaz de fungir como transductor en el biosensor) y se permite su uso en la detección del analito por subproductos generados.

La eficiencia del sensor se ve aumentada debido a la especificidad del sistema acuñada a la inmovilización de un bioreceptor biológico específico, en este caso ureasa, lo cual provoca velocidad en los análisis debido a la naturaleza de las reacciones, así como la capacidad de analizar únicamente los productos de interés en un ambiente no controlado o que, como la sangre, puede tener sales o proteínas filtradas que puedan alterar un análisis. Lo anterior nos permite asumir que existirá la posibilidad de evaluar el aumento en los niveles de urea en diferentes fluidos fisiológicos y determinar si esto puede ocasionar y ser el causante de problemas de salud.

4. Antecedentes

4.1 Biosensores

Los biosensores, como se muestra en la **Figura 4.1**, son instrumentos analíticos que convierten una respuesta biológica en una señal eléctrica, los cuales deben ser altamente específicos, independientes de parámetros físicos y reusables (Mehrotra, 2016). Los sensores son sistemas microelectromecánicos (MEMs) diseñados para medir cambios e interactuar con el ambiente. Bio MEMS son dispositivos que, como muchos, son diseñados para interactuar específicamente con muestras biológicas. Dispositivos como éstos son diseñados para interactuar con proteínas, células biológicas, reactivos médicos, etc. y pueden usarse para suministrar medicamentos u otro análisis médico *in situ* (Cárdenas, 2006).

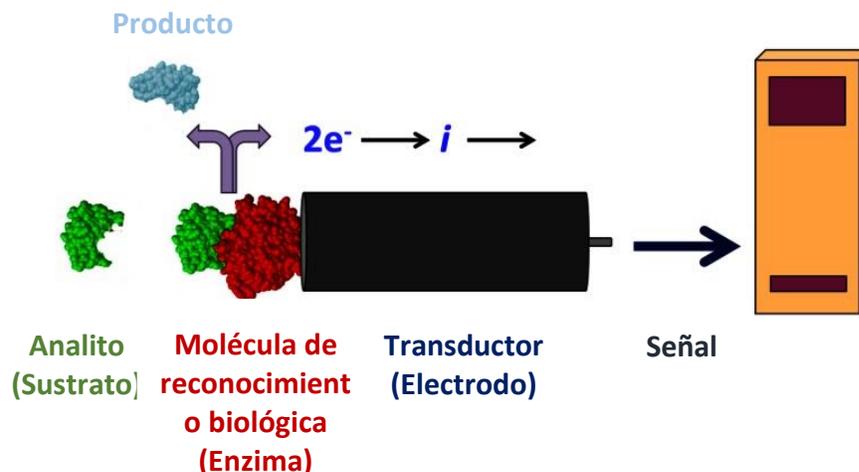


Figura 4.1. Diseño típico de un biosensor (Putzbach & Ronkainen, 2013).

Los biosensores generalmente son definidos como transductores que obtienen su energía de una entidad biológica como lo podrían ser las proteínas, ácidos nucleicos, organelos, entre otros, lo que ha permitido vencer las limitaciones energéticas del uso de una batería externa; en este caso el dispositivo proporciona la energía utilizada para el reconocimiento biológico (Conzuelo et al., 2018; Grattieri & Minteer, 2018; Y. Zhang et al., 2018), en efecto, suelen

clasificarse de acuerdo al tipo de elemento de biorreconocimiento y/o al transductor utilizado. Existe una gran variedad de transductores, como lo pueden ser los electroquímicos, que a su vez se clasifican en amperométricos, conductométricos y potenciométricos, ópticos, piezoeléctricos y calorimétricos.

En los últimos años ha surgido una nueva generación de biosensores llamados auto-alimentables. De acuerdo con Conzuelo y colaboradores (Conzuelo et al., 2018) los biosensores auto-alimentables más sencillos se basan en la detección del sustrato de una enzima actuando como combustible para su mismo funcionamiento, estos biosensores permiten la generación de energía proporcional a la concentración de analito (Baingane et al., 2017).

Anteriormente estos biosensores han permitido la detección de lactato y glucosa que han sido utilizados como biomarcador del proceso de isquemia, que es una disminución del flujo sanguíneo adecuadamente oxigenado, que se puede producir debido a una obstrucción de las arterias (Baingane et al., 2017); otro importante uso de los biosensores auto-alimentables es para la detección de la urea, que es el producto del mecanismo del nitrógeno siendo su detección de gran importancia ya que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y su análisis es necesario para la industria alimentaria, aplicaciones clínicas y el control ambiental (Singh et al., 2008).

4.1.1 Historia de los biosensores

El primer electrodo enzimático, también conocido como el “electrodo de Clark” fue fabricado en 1956 por Leland C. Clark y marcó la concepción del biosensor (Slaughter, G., 2006). Clark propuso su investigación como una forma en la que podemos “hacer los sensores electroquímicos más inteligentes”. Este biosensor fue utilizado para detectar oxígeno a través de una membrana semipermeable y un transductor fijado a un cable.

A partir de entonces, se han desarrollado muchos biosensores para detectar una amplia gama de parámetros bioquímicos. El desarrollo de biosensores que incorporan enzimas se basa en

la medición concentraciones de carbohidratos (glucosa, galactosa y fructosa), proteínas (colesterol y creatinina), aminoácidos (glutamato) y metabolitos (lactato y urea) en sangre y otros fluidos y tejidos corporales (Zhang, S., Wright, G., & Yang, Y., 2000).

El primer biosensor fue descrito acuñando el término electrodo enzimático, fue en 1967 que Updike y Hicks utilizaron el mismo término para describir un dispositivo similar en el que la enzima glucosa oxidasa fue inmovilizada en un gel de poliacrilamida sobre la superficie de un electrodo de oxígeno para una determinación de glucosa rápida y cuantitativa. En 1969 Guilbault y Montalvo utilizaron electrodos de vidrio acoplados con ureasa para medir la concentración de urea mediante una medición potenciométrica (Palchetti, 2009). De esta manera se comienza a conceptualizar el término de biosensor como la combinación de un sensor electroquímico con una especie biológica.

4.1.2 Fabricación de biosensores

Se pueden seguir diferentes rutas para elaborar un biosensor, sin embargo, existe una constante, debido a que sus materiales, dispositivos de transducción y métodos de inmovilización, que están íntimamente relacionados, requieren de un conocimiento multidisciplinario en química, biología e ingeniería (Mehrotra, P., 2016).

En su revisión sobre la fabricación de biosensores electrónicos de bajo costo, Anatoliy N. Sokolov, analiza la fabricación de dispositivos de detección basados en transistores orgánicos con una perspectiva de desarrollo de sensores capaces de operar en medios biológicamente relevantes, naturalmente, es esperado que la fabricación de sensores flexibles, miniaturizados y de bajo costo basados en electrónica orgánica mediante técnicas de alto rendimiento (por ejemplo, impresión) proporcione importantes beneficios para las aplicaciones de detección química y biológica.

Existen diversos tipos de biosensores dependiendo del diseño del transductor, los microtransductores ópticos son dispositivos de biosensado que generalmente se enfocan en dos modos de detección: fluorescencia y detección sin etiquetas, siendo la fluorescencia la

señal de transducción más popular en biosensores ópticos debido a su sensibilidad y selectividad. En la detección basada en fluorescencia, las moléculas objetivo o los elementos de biorreconocimiento se etiquetan con etiquetas fluorescentes. Por el contrario, la detección sin etiquetas emplea moléculas objetivo sin etiquetas para construir una plataforma de biosensor óptico rentable y fácil de usar que permite la medición cuantitativa de la interacción de la materia ligera.

Los biosensores que utilizan transductores acústicos se basan en un resonador de cristal de cuarzo que muestra una relación lineal entre la masa adsorbida en su superficie y la frecuencia de resonancia del cristal durante un evento de adsorción o unión. Por su parte, los transductores calorimétricos se usan para detectar actividad sustrato-enzima, actividad de unión proteica, reacciones de ácidos nucleicos y metabolismo celular que se basa en el recubrimiento o inmovilización de los elementos de biorreconocimiento, como enzimas o anticuerpos, en la superficie del transductor del calorímetro, y cuando el analito de interés se expone a las enzimas o anticuerpos inmovilizados, se produce la reacción bioquímica y la cantidad total de calor producido y la cinética de la reacción es proporcional a la concentración de los reactivos y a las constantes de velocidad de la reacción, respectivamente (Slaughter, G., 2006).

Finalmente están los biosensores electroquímicos que se basan en métodos electroquímicos actuales que sean sensibles, selectivos y demuestren un tiempo de respuesta rápido, lo que los hace muy adecuados para diversas aplicaciones analíticas. Se han explorado varias metodologías electroquímicas para el desarrollo de biosensores electroquímicos, como la conductimetría, la potenciometría y la amperometría.

En la fabricación y desarrollo de biosensores existen diversas características o propiedades que debemos tomar en consideración, dichas características se encuentran descritas en la **Tabla 4.1** y nos sirven para identificar las ventajas de un biosensor sobre análisis convencionales, dependiendo de las características con las cuales lo diseñemos.

Tabla 1. Principales propiedades de interés de un biosensor (Slaughter, G., 2006).

| Propiedad | Descripción |
|----------------------------------|--|
| Sensibilidad | La relación del cambio en la señal de salida para un cambio dado de analito (pendiente en la curva de calibración). |
| Especificidad | El biocatalizador es muy específico para el análisis y presenta una buena estabilidad en una gran cantidad de ensayos. |
| Selectividad | La relación del cambio en la señal de salida para un cambio dado de analito y especies interferentes. |
| Tiempo de respuesta | El tiempo para que la señal de salida alcance el 90% del valor de estado estable |
| Límite de detección (LOD) | Concentración derivada de la señal de salida más pequeña que se puede detectar con certeza para un procedimiento analítico dado. |
| Repetibilidad | Precisión en la señal de salida tomada en poco tiempo. |
| Reproducibilidad | Precisión de la señal de salida pero tomada en un intervalo largo de tiempo y conducido en diferentes laboratorios. |
| Relación señal-ruido | La relación de la señal analítica útil con respecto al ruido de fondo. |

4.2 Sistemas microelectromecánicos de tipo C-MEMS

Los MEMS, también conocidos como microsistemas, son definidos típicamente como dispositivos microscópicos diseñados, fabricados, y utilizados para interactuar o producir cambios dentro de un ambiente controlado (Nava-Jiménez & Escamilla-Santana, 2016). Estos pequeños y más sofisticados dispositivos que piensan actúan, miden y se comunican, están remplazando a los dispositivos actuales tradicionales en muchas aplicaciones.

Los sistemas microelectromecánicos basados en carbón (C-MEMS, por sus siglas en inglés) son candidatos idóneos para desarrollar biosensores. Aparte de las propiedades intrínsecas que hacen interesante al carbón (potenciales redox amplios, químicamente inertes,

estabilidad en medios ácidos o básicos), estos sistemas también poseen la facilidad de ser diseñados con la geometría deseada según sea la aplicación de interés (Braulio Cardenas-Benitez et al., 2019; Pilloni et al., 2019).

Los materiales que poseen celulosa como el papel permiten obtener, mediante pirólisis, plataformas de carbón con fibras entrecruzadas que aumentan el área superficial en comparación con las plataformas obtenidas de la pirolisis de resinas epóxicas como el poliacrilonitrilo (PAN) y el SU-8, de manera adicional poseen excelentes propiedades mecánicas y eléctricas.

4.3 Biosensor enzimático

Los biosensores enzimáticos son de amplio uso, principalmente por su alta selectividad, es decir, la capacidad de reconocer un tipo de compuesto en particular en una mezcla donde otros compuestos se encuentran presentes. Normalmente, un biosensor enzimático cuantifica la concentración del analito a partir del efecto producido por la reacción catalizada. Un biosensor se puede clasificar en óptico, piezoeléctrico, térmico o electroquímico dependiendo del transductor utilizado para medir dichos cambios. Los biosensores enzimáticos electroquímicos (aquellos cuyo transductor es un electrodo) son el tipo más común, debido a que presenta múltiples ventajas como: mínima preparación de la muestra, alta sensibilidad y selectividad, conversión directa de la señal electroquímica a señales eléctricas (lo que repercute en simplicidad de diseño y operación), rapidez, viabilidad en costo, miniaturización y portabilidad, entre otros.

Estos dispositivos utilizan las enzimas como elemento de reconocimiento biológico para la detección de sustancias de interés analítico. La generación del primer biosensor enzimático por Clark y Lions en 1962 para la detección de glucosa en sangre demostró, de manera práctica y evidente, la elevada eficiencia de las enzimas como elementos de reconocimiento de los biosensores.

4.3.1 Biosensores enzimáticos electroquímicos

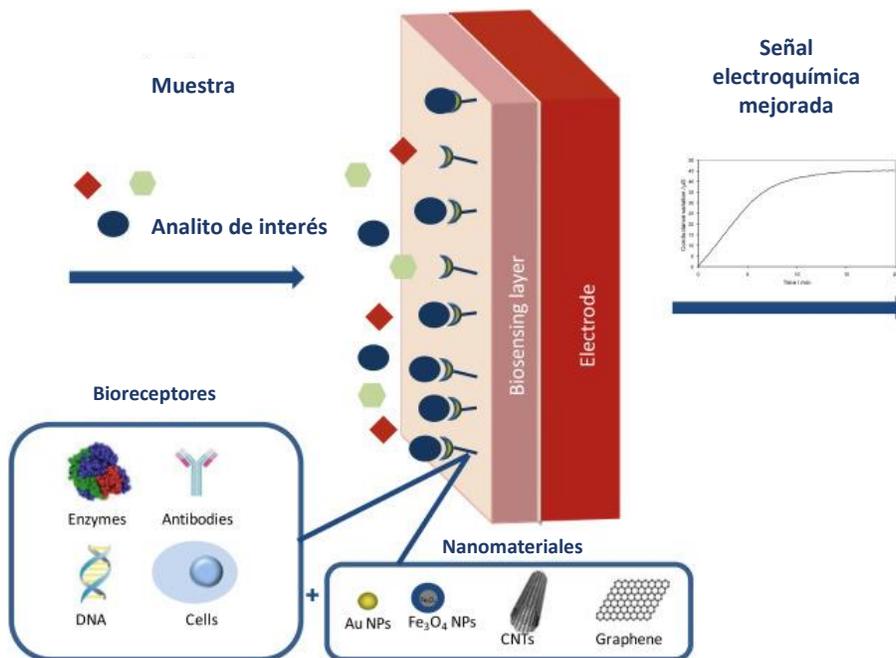


Figura 4.2. Principales constituyentes de un biosensor electroquímico fabricado con nanomateriales. (Dridi, F. et al, 2013).

Como su nombre lo indica, los biosensores electroquímicos se basan en procesos químicos y eléctricos, así como se muestra en la **Figura 4.2**, dichos dispositivos cuenta de diferentes partes, que corresponden a una capa de biosensado la cual puede diseñarse con diferentes materiales y/o moléculas pues debe ser receptiva a los analitos de interés, es decir debe de interactuar con las moléculas, enzimas o agentes que queremos analizar, finalmente se engloban las diferentes capas en un electrodo capaz de proporcionar una señal eléctrica a través de diferentes reacciones, como por ejemplo, una oxidación o reducción, que convierten dicha reacción en una señal medible.

Existen tres tipos de biosensores electroquímicos; conductométrico, potenciométrico y amperométrico, siendo este último el más estudiado para obtener información de sistemas biológicos mediante la medición de la corriente en un evento como la oxidación o reducción de una especie electroactiva en una reacción bioquímica (Slaughter, G., 2006).

4.3.2 Enzima

Las enzimas son los catalizadores de las reacciones en los sistemas biológicos, a menudo su poder catalítico excede al de los catalizadores sintéticos o inorgánicos. Poseen un elevado grado de especificidad respecto a sus sustratos, aceleran espectacularmente las reacciones químicas y funcionan en soluciones acuosas en condiciones muy suaves de temperatura y pH (Nelson D. et al, 2015).

El aislamiento y cristalización de la ureasa por James Sumner en 1926 impulsó los primeros estudios sobre las enzimas. Las enzimas son catalizadores eficientes que tienen muchas ventajas, son de gran importancia para la industria farmacéutica, biológica y biomédica jugando un papel vital en el control del proceso general (Alatawi et al., 2018). Pueden catalizar reacciones a condiciones de pH neutro y a temperatura ambiente, pero al utilizar disolventes orgánicos o variar la temperatura esto podría convertirse en una desventaja, para preparar biocatalizadores que respondan a estas condiciones se utiliza la inmovilización de enzimas (Kharisov & Eldin, 2018), de acuerdo con Brena (Brena & Batista-Viera, 2006) la inmovilización enzimática se refiere al aislamiento de una enzima en un espacio determinado confinando su actividad catalítica pudiendo ser utilizada de forma continua repetidas veces, esta es importante para lograr minimizar las pérdidas de actividad enzimática durante el proceso (Altinkaya, 2015).

Se ha podido demostrar que la inmovilización de enzimas en nanomateriales ha presentado grandes ventajas ante los sustratos sólidos, utilizar óxido de grafeno permite la inmovilización de enzimas sin hacer modificaciones en su superficie, el rendimiento de la enzima podría verse afectada por la estructura física y química del soporte así mismo por el método de inmovilización (Soozanipour & Taheri-Kafrani, 2018; J. Zhang et al., 2010).

4.3.3 Inmovilización enzimática

La inmovilización enzimática consiste en la fijación o retención dentro de soportes sólidos, obteniéndose sistemas enzimáticos heterogéneos que extienden el tiempo de actividad de la enzima, así como su estabilidad y el rango de condiciones en las que se puede operar. Otra característica de la inmovilización es que la heterogeneidad de los sistemas permite su fácil recuperación y separación del producto permitiendo que el sistema enzima-soporte pueda ser reutilizado repetidamente. Los métodos más utilizados para llevar a cabo la inmovilización enzimática son aquellos basados en la adsorción y deposición no covalentes son simples, baratos y efectivos, pero reversible; por atrapamiento físico, por la unión covalente y por último por bioconjugación.

La unión de la enzima al soporte puede ser tanto física como química. La unión física es una unión débil en comparación a la unión química y apenas puede mantener la enzima fijada al soporte; Las uniones químicas implican enlaces débiles y enlaces covalentes, por lo cual la unión que genera entre la enzima y el soporte es mejor. El objetivo de la inmovilización enzimática es que facilita la reutilización de la ureasa y al mismo tiempo permite una mejor relación costo-beneficio; para la inmovilización de ureasa se pueden usar diferentes soportes como los polímeros, un ejemplo de estos es el quitosano que es un polímero natural, se deriva de la quitina que es una poli (β -N-acetilglucosamina) que, por una reacción de desacetilación que elimina al menos el 50% de sus grupos acetilos y finalmente se convierte en quitosano (poli (β -N-acetilglucosamina-co- β -glucosamina) (Chellapandian & Krishnan, 1998).

4.3.3.1 Métodos de inmovilización enzimática

De acuerdo con Datta S., existen diferentes técnicas de inmovilización, siendo adsorción, unión covalente, unión por afinidad y atrapamiento las más comunes, pero también se han reportado la copolimerización y la encapsulación. Los biocatalizadores juegan un papel muy importante a nivel industrial, por lo cual se generan esfuerzos constantes para mejorar la actividad enzimática.

- **Adsorción**

La adsorción física o fisisorción es un método simple y rápido para la fabricación de biosensores enzimáticos que se basa en la unión de un adsorbato con un adsorbente por fuerzas de interacción débiles. Tratándose de nanopartículas, el método involucra la reducción de las mismas con un ligando cargado negativamente, como un citrato. Las nanopartículas reducidas pueden entonces asociarse con el ligando, formando finalmente una capa de citrato con carga negativa en la superficie coloidal de las nanopartículas. De esta manera, es posible ligar aminoácidos cargados positivamente que permitan la adsorción electrostática de enzimas en la superficie del electrodo modificado al sumergirlo en la solución que contenga la enzima.

Algunas enzimas pueden unirse al nanomaterial en orientaciones desfavorables que puedan provocar una disminución en su actividad.

La adsorción química o quimisorción involucra la unión covalente de la enzima con la superficie del electrodo. Liu et al., combinaron las ventajas de la técnica de auto-ensamblaje (SAM, por sus siglas en inglés) y las fuertes propiedades de adsorción de los grupos –SH y nanopartículas metálicas. La quimisorción es un procedimiento de inmovilización no específico y la unión covalente no regulada de una enzima a una superficie podría restringir el sitio activo o desnaturalizar la enzima.

Otro método covalente dirigido al sitio es la fabricación de una enzima modificada con una *etiqueta genética*. La enzima modificada contiene residuos o complejos añadidos artificialmente que pueden asignarse a un área específica de la enzima. Al unirse covalentemente a la región modificada, se puede lograr una orientación específica. Un estudio reciente modifica una enzima con un sitio de unión a metales, lo que permite la reorientación.

- **Monocapas auto-ensamblables (SAM)**

Aunque las SAM ofrecen muchas ventajas, están restringidas por dos razones principales. Por lo general, se forman capas muy compactas que restringen la velocidad de difusión de

los reactivos debido al hacinamiento de enzimas y provocan un impedimento estérico en el sitio activo que limita la bioactividad (Putzbach & Ronkainen, 2013).

- **Co-modificación con matriz de electrodos**

También reportado como copolimerización, es un método consiste en formar enlaces covalentes entre grupos de enzimas sin el uso de un material soporte o matriz de inmovilización. Se emplean enzimas inertes para formar un complejo enzimático que a su vez contiene la enzima de interés. Afecta la estructura y actividad de la enzima debido a que el proceso de copolimerización emplea reactivos que pueden desnaturalizar la enzima (Meléndez-Ortiz et al., 2014).

El uso de compositos permite un mayor y más fácil control de las cantidades relativas y la dispersión de las especies a escala nanométrica, lo que conduce a una menor densidad de enzimas.

- **Reticulación (Chemical Cross-Linking)**

La reticulación química se refiere a la unión intermolecular o intramolecular de dos o más moléculas mediante un enlace covalente. Los reactivos que se utilizan para este propósito se denominan "reactivos de reticulación" o "reticuladores". Según factores como la reactividad y la longitud del espaciador, estos se clasifican en diferentes tipos, cada uno con su propia función y aplicación específicas. En los últimos tiempos, el entrecruzamiento químico se ha convertido en una herramienta eficaz para el estudio de biomoléculas como las proteínas. Encuentra su aplicación en varios estudios, incluida la unión de proteínas a un soporte sólido para el estudio de receptores de membrana, complejos proteína-proteína, complejos proteína-ADN y otros (Arora, B., *et al*, 2017).

- **Atrapamiento**

El atrapamiento es la retención de enzimas por enlaces covalentes o no covalentes dentro de geles o fibras (Singh 2009), que funcionan como matriz; la naturaleza de la matriz varía según la aplicación deseada y usualmente consiste en esferas, fibras o microcápsulas del material soporte (Sheldon et al., 2007).

El atrapamiento por soportes nanoestructurados como nanofibras electrohiladas y materiales prístinos ha revolucionado el mundo de la inmovilización de enzimas con su amplia gama de aplicaciones en el campo de la química fina, biosensores biomédicos y biocombustibles (Dai y Xia 2006; Kim et al. 2006; Wang et al. 2009; Wen et al. 2011).

- **Encapsulación**

Se inmovilizan las enzimas dentro de una membrana de encapsulación semipermeable. La actividad enzimática resultante de este proceso depende principalmente de la estabilidad de la enzima dentro de la cápsula. Controlando la membrana utilizada es posible mediar el intercambio de masa entre el interior y el exterior de la cápsula (Wang et al., 2005).

Uniones covalentes y no covalentes: Una enzima no se puede unir a una plataforma de carbono sin antes haber recibido esta última un tratamiento que permita su funcionalización con grupos funcionales afines a la enzima en cuestión, en el caso de la ureasa, grupos funcionales $-NH_3$ podrían ser adecuados para su unión covalente, sin embargo, no permitiría la interacción con un material que lleve a cabo una reacción redox para la identificación electroquímica de la ureasa, pues el carbono no posee dicha cualidad, es por esto que una interfaz entre nanoestructura y nanopartícula nos permite analizar los sitios en los que la enzima puede unirse por atrapamiento.

4.3.4 Ureasa

La ureasa es una metaloenzima no redox involucrada en el ciclo global del nitrógeno en plantas, algas, hongos y varios microorganismos, su sitio de reacción bimetálico (Ni-II) cataliza la rápida descomposición hidrolítica de la urea para dar amoníaco y carbamato, esta reacción continúa hidrolizándose para formar amoníaco y ácido carbónico como productos (Mazzei et al., 2017). La actividad ureasa depende en gran medida del pH en el rango aproximadamente 4.5-10.5, con una reacción cada vez más lenta a medida que aumenta el rango, con un pH óptimo de 7.4.

La ureasa pertenece a la familia de las amidohidrolasas y fosfotriesterasas, posee entre 3 a 4 subunidades las cuales contienen cada una un sitio activo junto con algunos aminoácidos que forman parte de la cadena polipeptídica de la enzima. Los iones Ni característicos de la estructura enzimática de la ureasa se mantienen a una separación de 3,6 Å y están coordinados por un puente con la lisina acarbamilada y por un ion hidróxido; el primer ion de Ni por dos restos de histidina es penta-coordinado mientras que el segundo ion de Ni por dos restos de histidina y ácido aspártico es hexa-coordinado (Singh et al., 2008). Existen dos maneras en la que los inhibidores afectan a la enzima, dependiendo del grupo funcional se unen al ion Níquel mientras que existen compuestos como el 2-mercaptoethanol, acetohidroxamato, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) o fosforamidato que se unen a los aminoácidos presentes como a la histidina, ambos tipos de inhibidores provocan un cambio conformacional provocando el cierre del sitio activo. El mecanismo de reacción que actualmente es el más aceptado de la ureasa se basa en los diferentes papeles desempeñados por los dos iones de níquel: uno de ellos se une y activa la urea, el otro se une y activa la molécula de agua nucleófila (Benini et al., 1999). El mecanismo de reacción que actualmente es el más aceptado de la ureasa se basa en los diferentes papeles desempeñados por los dos iones de níquel: uno de ellos se une y activa la urea, el otro se une y activa la molécula de agua nucleófila (Tamaddon et al., 2016).

La determinación de la estructura de la enzima ureasa se ha realizado a partir de sustratos de diferentes bacterias, algunas de las cuales se encuentran descritas en la **Figura 4.3**; juntas, estas estructuras proporcionaron una descripción general de las relaciones estructura-función de las ureasas. Hoy en día se ha establecido bien que el andamiaje proteico general se conserva entre las ureasas de diferentes fuentes. En la mayoría de las ureasas bacterianas, la estructura cuaternaria está formada por un trímero ($\alpha\beta\gamma$)₃ de trímeros con tres sitios activos idénticos, cada uno ubicado en las subunidades α .

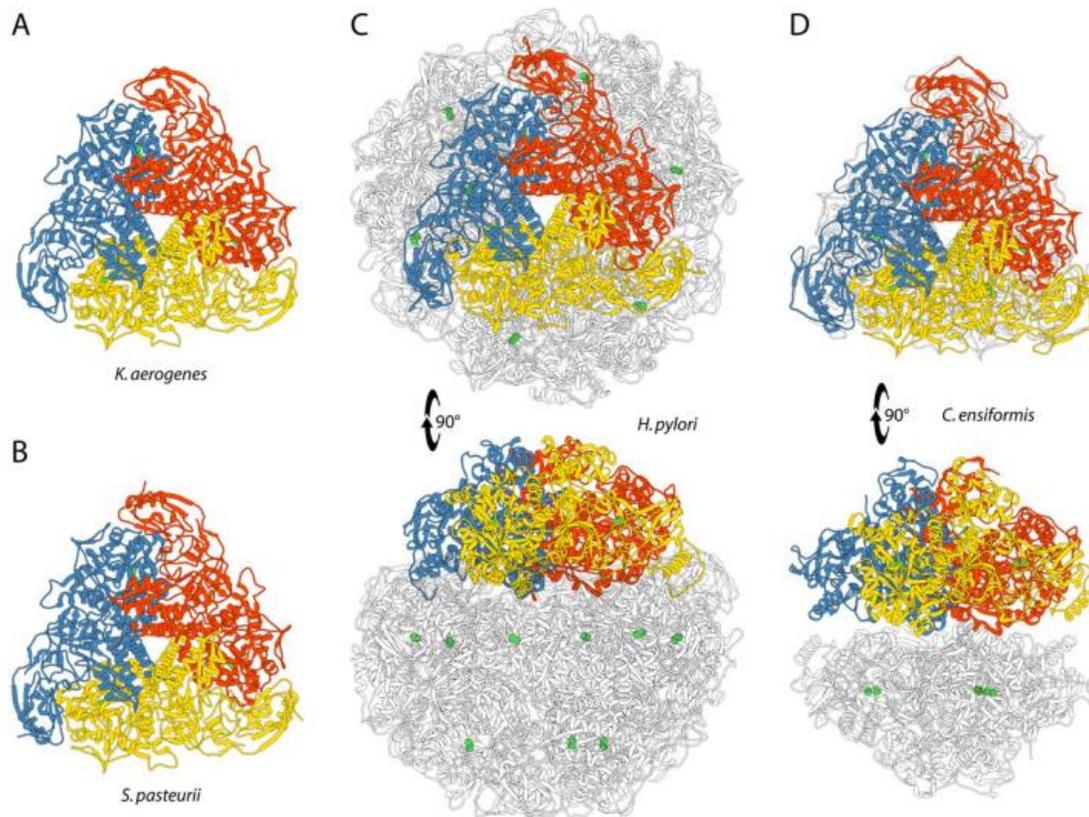


Figura 4.3. Diagramas de moño de la enzima ureasa de diferentes especies bacterianas. **A** *K. aerogenes*, **B** *S. pasteurii*, **C** *H. pylori* y **D** *C. ensiformis* (Mazzei, L. et al, 2020).

Los colores azul, rojo y amarillo en los diagramas de moño de la **Figura 4.3** evidencian las cadenas que componen el trímero que constituye la estructura cuaternaria mínima de la ureasa. Los iones de Ni (II) se indican como esferas verdes. Los paneles inferiores de los índices C y D se giran 90° alrededor del eje horizontal frente a los paneles superiores para proporcionar otro ángulo de vista.

La ureasa, de acuerdo con Hubalek (Hubalek et al., 2007), es una metaloenzima específica que cataliza la hidrólisis de la urea en amoníaco y dióxido de carbono bajo las condiciones fisiológicas adecuadas; esta reacción puede causar un aumento en el pH (Cox et al., 2000), puede ser producida por un alto número de bacterias de diferente taxonomía y no patógenas (Testerman et al., 2001), la especificidad de esta enzima es debido a los iones de Niquel (Ni) que se encuentran en el centro activo con una separación de 3.6Å, además ambos iones se

coordinan por dos Histinas mientras que uno de ellos se encuentra también unido a un Asparatato, el mecanismo se basa en el ataque del carbono de la urea por un hidróxido que se encuentra unido a Ni_2 (Benini et al., 1999; Carlsson & Nordlander, 2010). Esta enzima puede ser de gran interés para su uso en el desarrollo de biosensores auto-alimentables haciendo uso de los diferentes métodos de inmovilización enzimática. La inmovilización enzimática se refiere al aislamiento de una enzima en un espacio determinado confinando su actividad catalítica pudiendo ser utilizada de forma continua repetidas veces, esta es importante para lograr minimizar las pérdidas de actividad enzimática durante el proceso (Altinkaya, 2015).

4.4 Urea

La urea es el principal producto metabólico de residuos nitrogenados de la mayoría de los animales, se produce en el hígado, se transporta en el torrente sanguíneo a los riñones y se excreta en la orina, su concentración sérica en seres humanos sanos llega a ser entre 1-10 mM y la concentración de orina a alrededor de 0.5 M; la urea es un compuesto químico de fórmula $CO(NH_2)_2$ cuya estructura se muestra en la **Figura 4.4**; como se puede observar es un compuesto nitrogenado y un cambio en el ciclo úrico puede aumentar los niveles de amoníaco llegando a producir enfermedades en el organismo como citrulinemia, aciduria argininsuccínica y argininemia, debido a la falta de enzimas que participan en el ciclo de la urea.

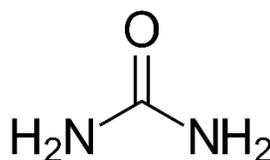


Figura 4.4. Fórmula estructural de la urea

En humanos, los niveles de urea sirven como biomarcadores de problemas renales y obstrucción del tracto urinario. Las altas concentraciones pueden causar sangrado gastrointestinal y deshidratación, mientras que los niveles más bajos de urea provocan

insuficiencia hepática, síndrome nefrítico y caquexia. Los niveles normales de urea en el suero sanguíneo y la orina están típicamente entre 3 y 7 mM y 0.1 a 0.4 M, respectivamente (Martínez-Castelao et al., 2014).

La urea puede encontrarse en otras áreas o industrias, por ejemplo, en la agricultura se usa intensamente como fertilizante nitrogenado. El nitrógeno ureico ingresa a la planta directamente o en forma de amonio o nitrato después de la degradación de la urea por los microbios del suelo (Witte, 2011). El principal problema con el uso de la urea como fuente de nitrógeno ha sido el control de las pérdidas de amoníaco al evitar la hidrólisis de la urea, ya que estos dos procesos están fuertemente acoplados en los suelos (Rodríguez et al., 2005).

4.4.1 El ciclo de la urea

El amoníaco puede ser producido por la descomposición de los aminoácidos o por las bacterias intestinales en los humanos. Si el nivel de amoníaco en la sangre aumenta demasiado, se vuelve tóxico para el cerebro. El ciclo de la urea elimina el amoníaco de la sangre y produce urea, que finalmente se excreta en forma de orina. Este ciclo lo llevan a cabo las células del hígado y, como sugiere su nombre, el último paso del proceso alimenta un paso anterior del ciclo (Yokoyama, M., 2021).

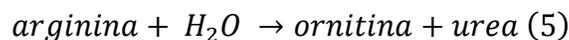
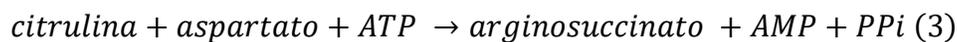
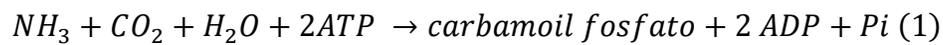
La ausencia de un ciclo completamente funcional puede ocasionar encefalopatía hiperamoneica y un daño cerebral irreversible en casos severos, de acuerdo al NCBI (Centro Nacional para Información Biotecnológica). Un fallo de ureagénesis ocurre debido a otra enfermedad adquirida, como lo puede ser la cirrosis, secundaria al alcoholismo, o una enfermedad secundaria debida a un defecto hereditario, usualmente una enzimopatía congénita (Yudkoff, M., 2005).

Durante el ciclo de urea la presencia de amoníaco es significativa en los diferentes procesos que se llevan a cabo. En este se lleva a cabo la remoción de una cantidad de 10 a 20 g de amoníaco como urea por día en un adulto sano. Como se mencionó anteriormente, la ausencia de un ciclo funcional puede alterar la cantidad de amoníaco en el organismo, como

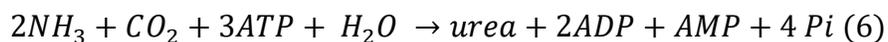
consecuencia, se puede padecer encefalopatía hiperamoniaca, que en casos severos puede conducir a lesiones cerebrales irreversibles.

Esquemático en la **Figura 4.5**, el ciclo de la urea consiste en 2 etapas, la etapa mitocondrial que, como su nombre lo indica, toma parte en la mitocondria de la célula y consiste en la formación de carbamoil fosfato a partir de amoníaco utilizando trifosfato de adenosina (ATP) para formar a su vez citrulina y la etapa citosólica en la que la citrulina es condensada para formar arginosuccinato que a su vez se separa en arginina y fumarato por acción de la arginosuccinato liasa, la arginina por acción de la arginasa se separa en urea y ornitina.

Las dos etapas se dividen a su vez en 5 reacciones controladas enzimáticamente, las primeras dos ocurren en la mitocondria y el resto tienen lugar en el citosol, como lo indica la etapa a la que pertenecen respectivamente, las reacciones son las siguientes:



La reacción global del ciclo de la urea se resume de la siguiente manera:



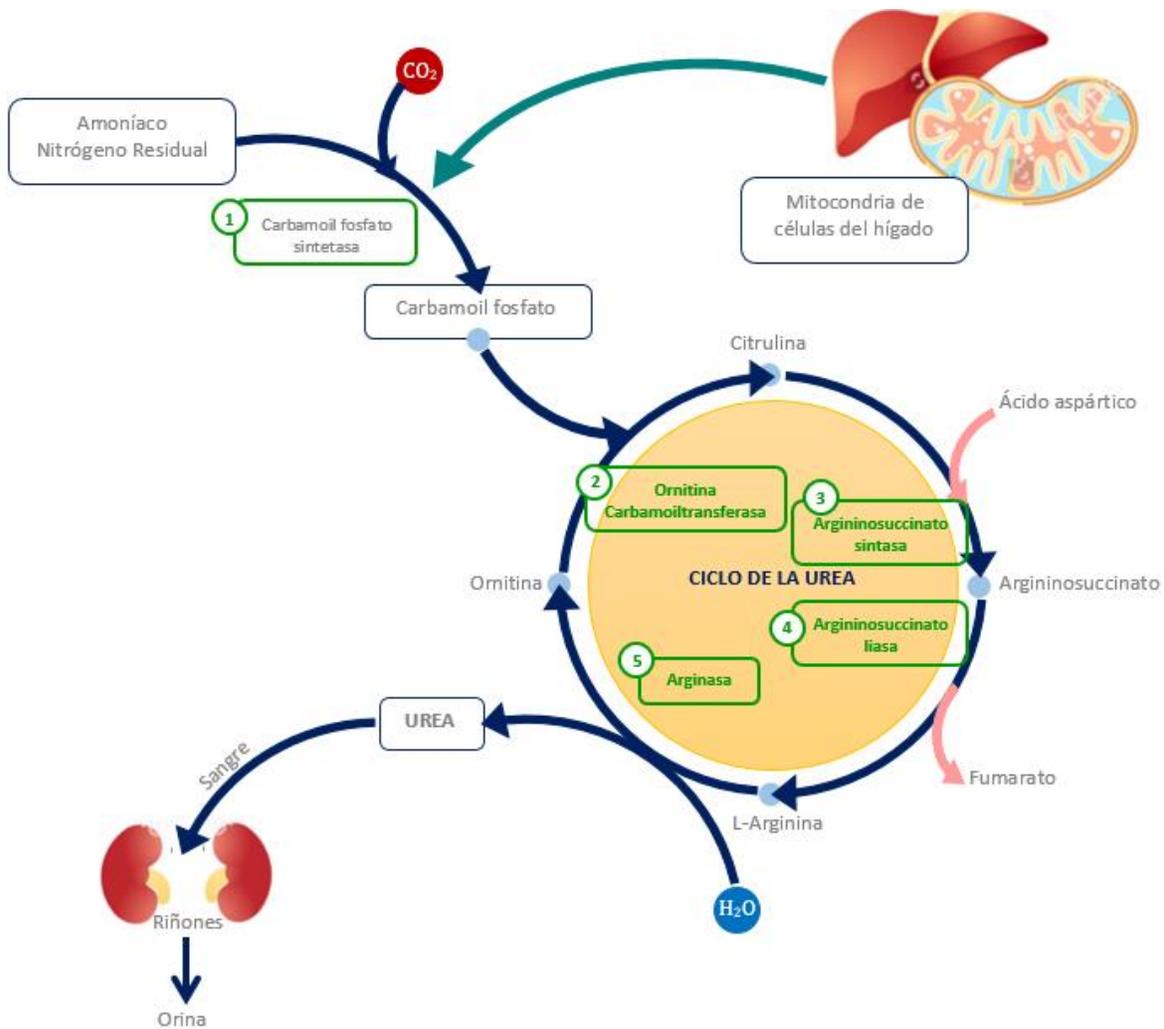


Figura 4.5. Esquema representativo del ciclo de la urea (Yokoyama, M., 2021).

4.4.2 Importancia de detección de urea en aplicaciones biomédicas

En humanos, la excreción diaria de urea en la orina es de alrededor de 30 g. La urea se excreta no solo por filtración glomerular, sino también por secreción tubular. Existen estudios que también han encontrado excreción de urea en el sudor, lágrimas, saliva y líquido digestivo (heces) en humanos (Yang, B., & Sands, J. M., 2014).

El proceso metabólico de la urea podría verse alterado en varias condiciones, como las dietas, las hormonas y las enfermedades. Luego, la urea se elimina a través de líquidos, especialmente orina.

Aunado a lo anterior, la detección de urea es de gran importancia, el nitrógeno ureico en sangre (BUN) se ha utilizado para evaluar la función renal durante décadas (Yang, B. & Sands, J. M., 2014). Sin embargo, también se puede aplicar en el cuidado de animales, un ejemplo de lo anterior sería en el análisis de productos lácteos, pues se ha informado que cuando el nitrógeno ureico de la leche (MUN) alcanza más de aproximadamente 20 mg/dl, puede indicar problemas patológicos subyacentes en las vacas, por lo tanto, el análisis de urea en la leche puede utilizarse como indicador de posibles problemas en la alimentación de vacas.

La urea es generada por las enzimas del ciclo de la urea, que se encuentran principalmente en el hígado, pero también se expresan de forma ubicua en niveles bajos en otros tejidos. Como se mencionó en la sección anterior, un cambio en el ciclo úrico puede aumentar los niveles de amoníaco y provocar enfermedades en el organismo como citrulinemia, aciduria arginina succínica y argininemia, debido a la falta de enzimas implicadas en el ciclo de la urea.

La urea también desempeña múltiples funciones clínicas en neuropsiquiatría. Se ha demostrado firmemente que los pacientes con accidente cerebrovascular isquémico agudo tienen un mal pronóstico con disfunción renal. Solo con base en lo anterior, los estudios demostraron que el cociente BUN/creatinina puede ser un predictor novedoso del deterioro temprano del accidente cerebrovascular y un BUN elevado es un predictor independiente asociado con un resultado clínico deficiente y mortalidad en pacientes con accidente cerebrovascular isquémico agudo (Yang, B. & Sands, J. M., 2014).

Aún en la industria de los alimentos podemos encontrar biosensores utilizados para la detección de patógenos en los alimentos. La presencia de *Escherichia Coli* en vegetales, es un bioindicador de contaminación fecal en alimentos. La *E. Coli* se ha medido mediante la detección de la variación en el pH causada por el amoníaco, recordando que el amoníaco es el producto principal de la reacción de hidrólisis de urea (producido por el conjugado de

anticuerpos de ureasa-*E coli*), utilizando sistemas potenciométricos de biodetección (Mehrotra, P. 2016).

4.4.3 Identificación de urea por sensores electroquímicos.

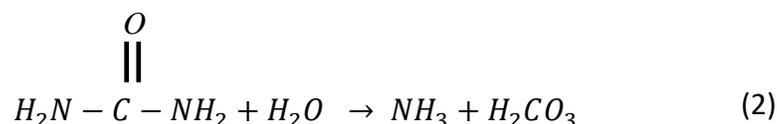
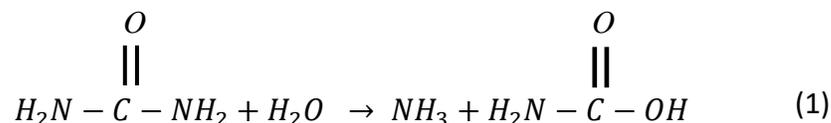
La urea ($\text{O}=\text{C}(-\text{NH}_2)_2$), el analito de interés es una pequeña molécula plana, trigonal y soluble en agua que fue reconocida como un componente principal de la orina en el siglo XVII. También fue la primera molécula orgánica sintetizada a partir de sales inorgánicas (Yang, B. & Sands, J. M., 2014) lo que permite su uso para experimentación en ambientes controlados. También es un producto final del metabolismo del nitrógeno con una gran importancia en la química clínica y la industria láctea.

Han existido diferentes formas en las que se ha realizado detección de urea; como se menciona en la sección 4.3, los biosensores electroquímicos basan su función en la identificación de una señal analítica producida por la oxidación o reducción de una especie química, siendo este el caso del amoníaco, NH_3 , podemos obtener una señal por oxidación.

El análisis e identificación de urea involucran diferentes procesos: contacto del electrodo con la sustancia, hidrólisis de la urea llevada a cabo por la ureasa presente en el electrodo, producción y liberación de amoníaco en la celda, interacción del amoníaco con las nanopartículas de iridio para la formación de subespecies a partir del amoníaco para generar una señal anódica debida a el proceso de una reacción de óxido reducción que confirmará la presencia de urea en la solución. Dicha señal desplegará un valor de corriente que puede ser estandarizado con el área del electrodo.

La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea para producir amoníaco y carbamato, que se hidroliza espontáneamente para formar ácido carbónico y una segunda molécula de amoníaco (Moblely, H. L. & Hausinger, R. P., 1989) como se muestra en las reacciones (1) y (2) así como se representa en la **Figura 4.6**.

Sabiendo que la urea es hidrolizada por la ureasa a iones de amoniaco y CO₂, podemos identificarla a través de un método colorimétrico en que los iones amoniaco reaccionan en pH alcalino con salicilato e hipocloruro de sodio, bajo la acción catalizadora del nitroprusato de sodio para formar azul de indofenol. La intensidad de color formado es proporcional a la cantidad de urea en la muestra (Labtest Diagnóstica S.A., 2013).



A pH fisiológico, el protón del ácido carbónico se disocia y las moléculas de amoniaco se equilibran con el agua para protonarse, lo que resulta en un aumento neto del pH (Mobley, H. L. & Hausinger, R. P., 1989). Las nanoparticulas de óxido de iridio (IrO₂NP) oxidan el amoníaco producido durante la hidrólisis como se ve en la siguiente reacción:

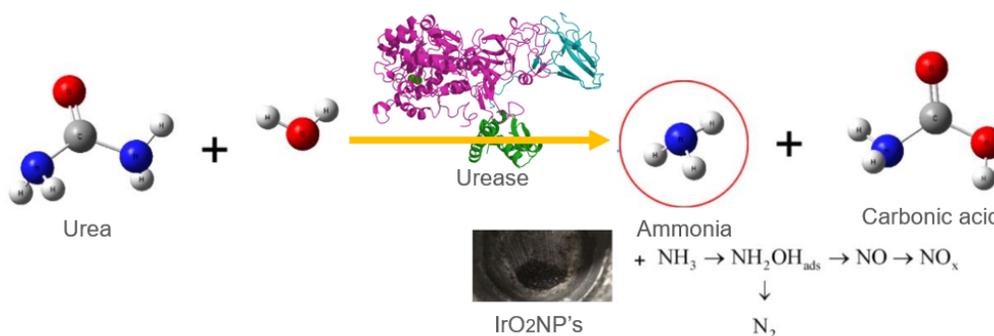
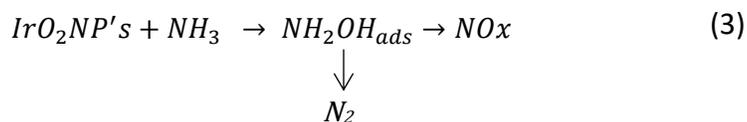


Figura 4.6. Esquema de las reacciones generadas para la identificación de urea a través de la oxidación del amoníaco (NH₃).

En la **Tabla 2** se muestran diferentes biosensores utilizados en la detección de urea como sus características.

Tabla 2. Características de los biosensores de urea (Singh et al., 2008).

| Método de Inmovilización | Transductor | Estabilidad | Límite de detección | Muestra |
|---|--------------------|---|----------------------------|----------------|
| Red de Nylon | Amperométrico | 4 días | 10^{-5} M | Urea en saliva |
| Membrana polimérica de poliuretano acetilato | Potenciométrico | > 30 días / 4°C | 0.04 mM | — |
| Polianilina-Nafion/Au/Cerámico | Amperométrico | — | 3 mg/dl | — |
| Electrodo compuesto de grafito y platino | Amperométrico | 3 meses | 3 mM | Urea en sangre |
| Glutaraldehído y polianilina | Potenciométrico | 4 semanas/ 25°C en buffer de fosfato | $1 \times 10^{-2.5}$ M | — |
| Polímeros catiónicos | Potenciométrico | > 1 mes | 10^{-4} M | — |

4.5 Soportes para biosensores

Existe una gran cantidad de materiales utilizados en la fabricación de soportes para inmovilización. Principalmente se reporta el uso de polímeros naturales, así como de materiales inorgánicos, entre los que se encuentra el carbón activado, que es usado para la adsorción de enzimas. Últimamente, se ha mostrado que partículas de carbón activado mesoporoso poseen grandes sitios de contacto para inmovilización enzimática, éstas han sido

utilizadas para la inmovilización de ácido proteasas y lipasas acídicas, mantenimiento, buena estabilidad y eficiencia catalítica (Datta S., *et al* 2012).

La nanotecnología ha proporcionado los medios para optimizar los biosensores a macro y microescala existentes a nanoescala al permitir la reducción de las dimensiones de los elementos del biosensor para que la relación señal-ruido pueda aumentarse para el evento de reconocimiento. (G. Slaughter).

El uso de nanomateriales como soportes de enzimas deshidrogenasas en bioceldas de combustible ya ha sido reportado (A. de-Poilpiquet et al., 2014; Aquino et al., 2011; Kim et al., 2006; Wu et al., 2007), lo cual demuestra la viabilidad del uso de nanoestructuras para la inmovilización de enzimas en aplicaciones electroquímicas. Los materiales nanoestructurados poseen gran área superficial, tamaño y propiedades físicas, es decir, mejoran las propiedades eléctricas de conductividad que se ven favorecidas para la elaboración del transductor de un biosensor.

4.6 Carbono

El carbono, a diferencia de todos los demás elementos de la tabla periódica, puede formar una inmensa diversidad de compuestos, desde los más simples hasta los asombrosamente complejos. Los átomos de carbono pueden unirse entre sí formando cadenas, anillos u otras estructuras más complejas y enlazarse a átomos o grupos de átomos que confieren a las moléculas resultantes propiedades específicas. La enorme diversidad en los compuestos del carbono hace de su estudio químico una importante área del conocimiento básico y aplicado de la ciencia actual (Mc Murry, J., 2017).

Los materiales de carbono presentan una amplia variedad de propiedades que los hace insustituibles en campos de aplicación muy diferentes (Tascón; J, 2007). Específicamente, el carbono natural como el carbono modificado por tratamiento ácido son materiales de soporte idóneos para la inmovilización enzimática por adsorción.

El carbono se presenta con diferentes formas o arreglos moleculares, a los cuales conocemos como alótopos, los cuales poseen propiedades químicas y físicas muy diferentes.

El uso de una forma alotrópica de carbono nanoestructurada favorece las interacciones que pueden existir entre material y sustrato, teniendo lo anterior en consideración, hay varias microestructuras disponibles de materiales de carbono, como grafito, carbono vítreo, fibra de carbono, nanotubos, polvos amorfos y diamante. Con el progreso continuo de la nanotecnología en la ciencia de los materiales, los nanomateriales de carbono, especialmente los nanotubos de carbono (CNT) y las nanofibras de carbono (CNF), han atraído una atención considerable en el electroanálisis y la biodetección (Huang J., 2010).

4.6.1 Nanoestructuras de carbono

4.6.1.1 Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono (CNT) son cilindros de carbono largos y delgados, descubiertos por primera vez por Iijima en 1991; han sido objeto de una considerable investigación en los últimos años debido a su combinación excepcional de propiedades mecánicas y eléctricas que incluyen: alta resistencia (resistencia a la tracción alrededor de 100-300 GPa), alta rigidez (módulo elástico de hasta 1 TPa), notable flexibilidad y muy alta conductividad (R.B. Mathur, 2008).

Esta combinación única de propiedades ha promovido el uso de los CNT en muchos tipos de investigaciones, incluyendo el campo biomédico. En el campo de los biosensores, los CNT se han propuesto como elemento de detección para detectar y controlar varias enfermedades, especialmente la diabetes, pero también infecciones bacterianas. Por ejemplo, Punbusayakul *et al.* utilizaron el monitoreo electroquímico de inmunocomplejos para la detección de salmonella, reduciendo así el tiempo de detección y facilitando la preparación de la muestra en comparación con los métodos existente. También se obtuvo un inmunosensor para adiponectina, un biomarcador de obesidad, injertando anticuerpos orientados en la superficie de DWCNT (nanotubos de carbono de pared doble) para inmovilizarlos. Un segundo anticuerpo, conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP)-estreptavidina, se une a la

adiponectina y reacciona con el sustrato durante el control de voltamperometría cíclica, lo que permite una detección y cuantificación rápidas (Simon, J., *et al* 2019).

4.6.1.2 Carbono vulcan

El carbón vulcan es un tipo de carbón nanoestructurado perteneciente al grupo de carbones conocidos como negros de carbón (Carbon Black en inglés), han sido extensamente usados en el campo de la electroquímica debido a alta distribución mesoporosa, es decir, posee poros con tamaños entre los 2 y 50 nm, sus buenas propiedades eléctricas y su alta disponibilidad y bajo costo, debido a que se obtienen por la descomposición térmica de hidrocarburos derivados de fuentes de petróleo.

En la industria que se dedica a la fabricación de llantas de hule, el carbono carbon-black es un componente fundamental pues asegura la correcta vulcanización en las reacciones de reticulación con el azufre. La vulcanización del hule natural mejora sus propiedades de manera importante, aumenta la elasticidad, la resistencia a la fricción y al desgarre, de tal manera que se producen llantas, bandas y mangueras de alto desempeño para los transportes pesados y ligeros (Alquisira, J. P., 2019).

Diferentes tipos de negros de carbón han sido utilizados como electrodos en supercapacitores o soportes catalíticos, estos son el negro acetileno, Ketjen Black, Black Pearl o Vulcan XC 72, siendo este último el más destacado por su gran área superficial ($\approx 250 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) y alta conductividad eléctrica ($\approx 2.77 \text{ Scm}^{-1}$) (Pérez-Rodríguez, S. et al., 2017).

4.6.1.3 Nanofibras de carbono

Las nanofibras de carbono (CNF) son discontinuas, altamente grafíticas, altamente compatibles con la mayoría de las técnicas de procesamiento de polímeros y se pueden dispersar en modo isotrópico o anisotrópico.

Las CNF tienen excelentes propiedades mecánicas, alta conductividad eléctrica y alta conductividad térmica, que se pueden impartir a una amplia gama de matrices, incluidos

termoplásticos, termoestables, elastómeros, cerámicas y metales. Las nanofibras de carbono también tienen un estado de superficie único, lo que facilita la funcionalización y otras técnicas de modificación de la superficie para adaptar/diseñar la nanofibra al polímero huésped o la aplicación. (*Sigma Aldrich: sigmaaldrich.com*). De manera complementaria a sus propiedades eléctricas, su *band-gap* puede variar desde 0 hasta 2eV. Su conductividad eléctrica varía permitiendo exhibir un comportamiento metálico o semiconductor, son estas características las que los convierten en grandes candidatos en el proceso de miniaturización electrónica.

Otras de sus propiedades químicas se sustentan en que estas nanoestructuras poseen la riqueza de la química del carbono. Permiten el acoplamiento de estructuras químicas tanto en sus paredes como en los extremos. Dentro de sus propiedades térmicas, encontramos que son estables a altas temperaturas, presentan una alta conductividad térmica en la dirección de su eje. En dirección perpendicular al eje, lo reflejan. Finalmente, en sus propiedades ópticas encontramos que producen corrientes eléctricas al ser iluminados con luz visible (y a la inversa), presentan fotoluminiscencia y son absorbentes de radiación visible e infrarroja.

Se ha reportado el uso de nanofibras de carbono (CNF) para inmovilización de enzimas deshidrogenasas (Huang et al, 2008; Weeks et al., 2008). Así mismo poseen buenas características de catalizador, tomando en cuenta que al ser sintetizadas, la composición del gas y la temperatura intervienen en el diámetro de las nanofibras, y en consecuencia tienen influencia sobre otras propiedades como la textura, la densidad y la resistencia mecánica, entre otras. La textura es altamente mesoporosa, siendo los “poros” el resultado del espacio entre las nanofibras, a lo contrario de lo que ocurre en los soportes convencionales y la presencia de poros (del Río, D. S., 2011), la porosidad del material tiene influencia en el área superficial del mismo.

4.7 Funcionalización de plataformas de carbono

La funcionalización se define como la modificación de propiedades por la adsorción de átomos o moléculas en las paredes exteriores de los nanotubos de carbono, las nanofibras

de carbono o sobre la superficie del carbon-black. Este método requiere de la modificación covalente de la forma alotrópica de carbono en cuestión, o bien, de la superficie del electrodo con grupos funcionales que se unirán a su superficie.

Por medio de la oxidación química de nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT) se pueden agregar diversos grupos funcionales como ácidos carboxílicos, aminas y amidas. Como se observa en la **Figura 4.7**, los SWCNT se pueden oxidar al reaccionar con una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico con lo cual se introducen grupos carboxílicos en sus extremos. Mediante la química del grupo carboxílico y en muchos casos su activación a cloruros de adío, permite el acoplamiento de moléculas por medio de unión covalente formando enlaces tipo éster y amidas.

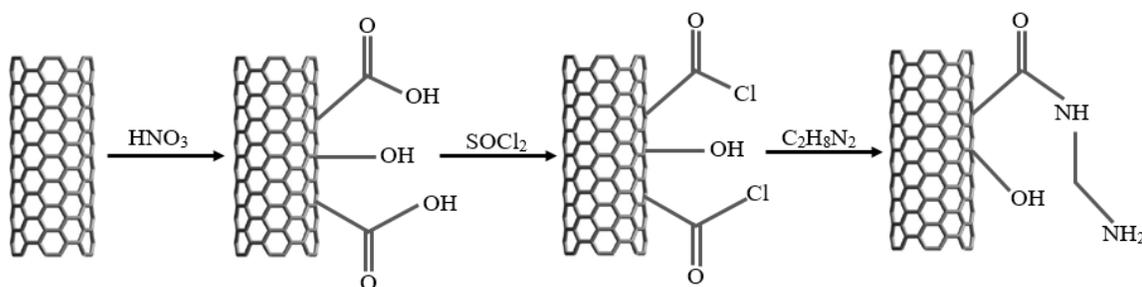


Figura 4.7. Esquema de funcionalización de SWCNT con aminas (Andrade Guel, M. L., *et al*, 2012).

Se aprecia que en las funcionalizaciones covalentes se crean enlaces entre el carbono y diferentes grupos funcionales, por su parte, las funcionalizaciones no covalentes se basan en la adsorción de moléculas como surfactantes, compuestos aromáticos y polímeros como poliacrilamida, poliestireno, entre otros, que no alteran las propiedades de los NTC. González Velázquez indica que el anclado o decoración de nanopartículas sobre nanotubos de carbono, se puede realizar principalmente por dos métodos:

1. Unión de nanopartículas presintetizadas a los Nanotubos de Carbono: este anclaje se logra mediante el uso de ciertos enlaces orgánicos bifuncionales, covalentes o no covalentes, a nanopartículas previamente sintetizadas.

2. Crecimiento de nanopartículas directamente en los Nanotubos de Carbono: Este método se realiza con el uso de sales o precursores de las nanopartículas, las cuales pueden ser sintetizadas directamente sobre los nanotubos de carbono; las NP's se unen a las paredes de los CNT a través de enlaces de Van der Waals u otras interacciones débiles. Entre los métodos utilizados para la reducción, se encuentran: aplicación de calor, luz, y agentes reductores (González Velázquez, V. J., 2015).

La información anterior la extrapolamos hacia las demás estructuras del carbono, debido a que en lugar de requerir un tratamiento previo, la nanopartículas se sintetizarán formando enlaces débiles sobre la superficie o intersticios de las nanoestructuras utilizadas como soporte.

4.8 Nanopartículas de óxidos metálicos

4.8.1 Nanopartículas de dióxido de iridio

La propiedad fundamental del Iridio para este trabajo es su capacidad de oxidar el amonio generado durante la reacción de hidrólisis de la urea. A pesar de la escasez y el costo del óxido de iridio, sigue siendo el material de elección en numerosos campos de la ciencia y aplicaciones, incluidos capacitores, electrocromismo, sensores y varias electrocatálisis de oxidación (por ejemplo, reacción de evolución de cloro, desintoxicación y reacción de evolución de oxígeno). Tal versatilidad se atribuye a las distintas características de los óxidos de iridio, como su actividad, biocompatibilidad, conductividad y durabilidad. Las características y propiedades de los óxidos de iridio dependen en gran medida del método de fabricación (Jang, H., & Lee, J., 2020).

En el caso del iridio, se sabía que era el catalizador de óxido más activo y estable para la oxidación del agua durante muchos años, pero esperó trabajo en la dirección de la catálisis homogénea hasta finales de la década de 2000-2010. (Blakemore et al, 2015).

4.9 Electroodos autoalimentables y dispositivos microfluídicos

Como hemos revisado previamente, los biosensores ofrecen mediciones simples y en tiempo real de analitos en fluidos fisiológicos. La detección y el seguimiento se realizan acoplando una reacción biológica a un transductor que convierte el evento de reconocimiento en una señal medible. La mayoría de los biosensores requieren de una fuente de poder para funcionar correctamente, la cual es usualmente prevista por baterías de litio, sin embargo, dichas baterías requieren de ser cargadas frecuentemente, tienen un tiempo de vida limitado y son difíciles de miniaturizar (Gonzalez-Solino, C., & Lorenzo, M. D., 2018).

En el contexto de la búsqueda de dispositivos autónomos, las celdas de combustible enzimáticas (EFC por sus siglas en inglés) poseen gran potencial para el biosensado autónomo, siendo dispositivos electroquímicos que aprovechan el uso de enzimas redox para generar energía eléctrica a partir de la energía química presente en biomoléculas, para funcionar de manera sinérgica como fuente de energía y biosensor, debido a que tampoco requiere de un potencióstato (Gonzalez-Solino, C., & Lorenzo, M. D., 2018, Grattieri, M., & Minter, S. D. 2018).

En los biosensores amperométricos se aplica un potencial constante y se mide la corriente entre el electrodo de detección y el contraelectrodo, dicha corriente se relaciona con la concentración de analito detectado, este tipo de sensor es muy simple en la electrónica requerida y posee alta sensibilidad, haciéndolos electrodos electroquímicos idóneos para combinarlos, o bien, acoplarlos a una celda de combustible con el fin de crear un biosensor autoalimentable.

En 2001, Willner y Katz acuñaron el término "biosensor autoalimentado" para una celda de biocombustible que generaba energía proporcional a la concentración del analito. De acuerdo a Grattieri, M., este fue el comienzo de un nuevo tipo de biosensor electroquímico, pero también la fusión de dos campos: el campo de la celda de combustible y el campo del sensor (Grattieri, M., & Minter, S. D. 2018).

Las celdas de combustible a diferencia de los biosensores que suelen operar en modo de 3 electrodos operan haciendo uso de un ánodo y un cátodo, siendo de principal interés generar un gran potencial de circuito abierto, grandes corrientes de cortocircuito y máximas densidades de potencia a través de mejoras en los catalizadores y materiales utilizados, así como el diseño de la celda, para lo cual se puede hacer uso de celdas microfluídicas.

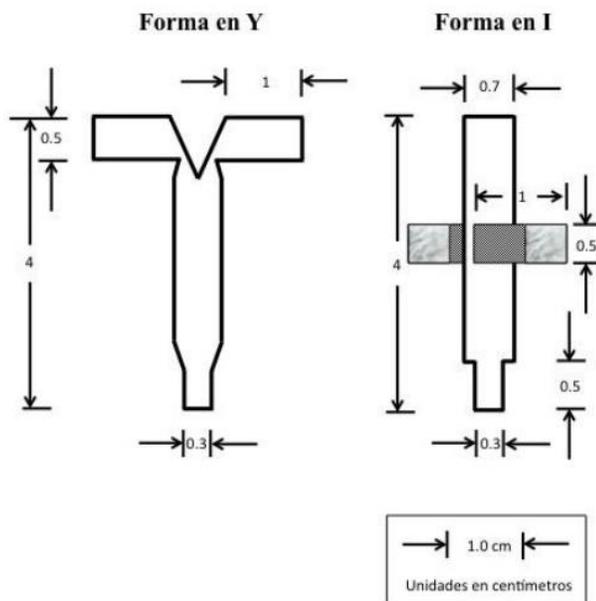


Figura 4.8. Diseño de celdas de combustible microfluídicas de forma en Y y forma en I (Castillo-Martínez, L., Dector, A. *et al* 2020).

Por convención, una celda microfluídica se define como una celda capaz de llevar a cabo la entrega y remoción de fluidos con la finalidad de obtener energía eléctrica a partir de compuestos químicos, los sitios de reacción, así como los electrodos se encuentran confinados a un canal microfluídico. Normalmente este tipo de celdas operan en una configuración de flujo co-laminar sin una barrera física (Kjeang, E., 2009), es decir, no existe una membrana que separe el cátodo del ánodo. Como se muestra en la **Figura 4.8** se pueden elaborar celdas microfluídicas con diseños diferentes, del lado izquierdo se encuentra un diseño de dos flujos o en forma de “Y”, el segundo diseño consiste en una sola entrada d combustible, forma de “I”.

Existen también las celdas de biocombustible enzimáticas, las cuales consisten de celdas de biocombustible sin membrana en las que se aprovecha la energía bioquímica del combustible orgánico o del analito, es decir, producen bioelectricidad sin generar productos tóxicos.

La creación y diseño de celdas de combustible enzimáticas se basan en el acoplamiento de una especie biológica capaz de producir una señal de oxidación, como lo hicieron Willner y Katz para identificar glucosa al oxidarla con una enzima oxidoreductasa, durante los últimos años se ha modificado dicho diseño para incluir y acoplar elementos de reconocimiento basados en afinidad. Por ejemplo, Guo *et al.*, diseñaron un inmunosensor autoalimentado donde la enzima del cátodo (bilirrubina oxidasa) de la celda de biocombustible enzimática de glucosa/oxígeno no se inmoviliza en el cátodo, sino que se une con un anticuerpo a un nanotubo de carbono (Grattieri, M., & Minteer, S. D. 2018).

La celda de combustible microfluídica constituye una de las etapas finales para la evaluación y/o construcción del biosensor que se formula en este trabajo. Recordando el proceso, se proponen 3 nanoestructuras de carbono funcionalizadas/decoradas con IrO₂NP's, a dicho sistema se inmovilizará enzima ureasa, todo esto con la finalidad de evaluar el desempeño de la parte nanotecnológica en el desarrollo de un biosensor y la posibilidad de crear un dispositivo autoalimentable con buenas características, como bajo límite de detección y alta sensibilidad.

5. Hipótesis y Objetivos

5.1 Hipótesis.

La inmovilización de la enzima ureasa sobre plataformas de carbono nanoestructuradas brindará al sistema la estabilidad química para interactuar con urea en soluciones a pH neutro. La funcionalización del sistema con nanopartículas de óxido de iridio permitirá el análisis de la urea a través de un método REDOX para ser aplicado en la construcción del electrodo de un biosensor enzimático.

Los resultados de los análisis electroquímicos (voltametría diferencial de pulsos y voltametría cíclica) se verán afectados por la nanoestructura de carbono utilizada en la construcción del electrodo, proporcionando diferentes valores de potencial dependiendo de las características fisicoquímicas de la nanoestructura.

5.2 Objetivos

5.2.1 *Objetivo general*

Evaluar el rendimiento y la eficiencia de diferentes nanoestructuras de carbono funcionalizadas para el desarrollo de biosensores de urea.

5.2.2 *Objetivos específicos*

- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de IrO₂.
- Desarrollar electrodos nanoestructurados decorando diferentes plataformas de carbono con nanopartículas de IrO₂ para la posterior inmovilización de la enzima ureasa.
- Caracterizar bioquímicamente la estabilidad enzimática y la eficacia de la inmovilización.
- Evaluar electroquímicamente los electrodos desarrollados para la detección de urea.
- Evaluar el desempeño de los electrodos en una celda de combustible microfluidica.

6. Metodología

Las nanoestructuras de carbono fueron recibidas por parte del laboratorio de Biosensores de la Universidad Autónoma de Querétaro (Campus Aeropuerto), todas las plataformas fueron subsecuentemente decoradas con nanopartículas de iridio/dióxido de iridio sintetizadas por método químico, la síntesis de las nanopartículas en solución con las diferentes nanoestructuras se realizó en una relación 1:4, obteniendo tres sistemas:

- A. MWCNT / IrO₂NP's
- B. CNF / IrO₂NP's
- C. Vulcan / IrNP's

6.1 Síntesis de nanopartículas de dióxido de iridio

La síntesis de nanopartículas fue conducida por un método químico similar al reportado por Chakrapani, K., & Sampath, S. (2015) (**Figura 6.1**). Brevemente, la síntesis se lleva a cabo en un medio de 50 – 100 mL de etilenglicol precalentado a 80°C, en el que se lleva a cabo la reacción entre Cloruro de Iridio (IrCl₃) con Borohidruro de Sodio (NaBH₄).

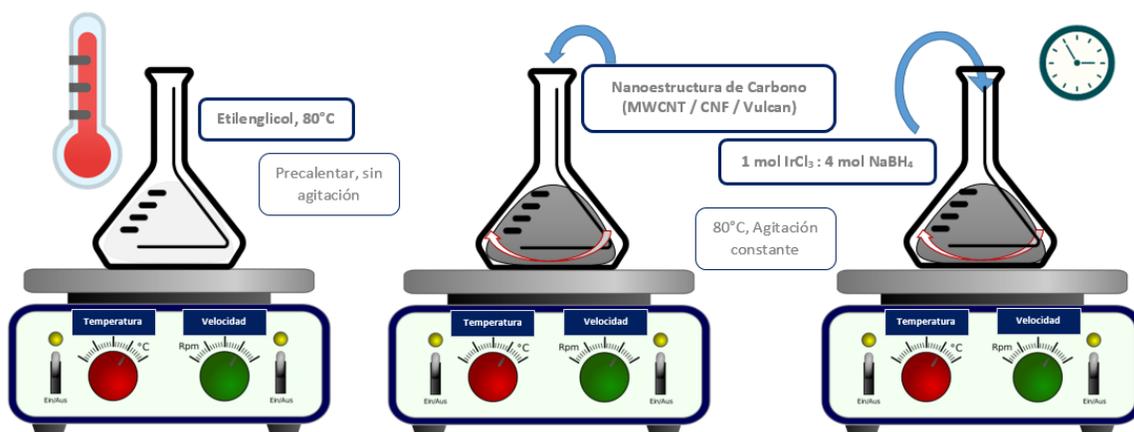


Figura 6.1. Esquema de la síntesis de nanopartículas de Iridio / Dióxido de Iridio por método químico.

6.1.1 Nanopartículas de iridio sin soporte

Se utilizó cloruro de iridio (IrCl_3) como la sal de la cual se obtienen las nanopartículas, el IrCl_3 corresponde al agente que se redujo y NaBH_4 fue utilizado como agente reductor; la reacción se llevó a cabo en etilenglicol, que actúa como agente estabilizante con el propósito de mantener un tamaño de partícula pequeño, dentro del rango de los nanómetros, y la posibilidad de evitar aglomeraciones.

Se centrifugó la solución en tubos falcon utilizando una cantidad de 5 mL de solución de nanopartículas, las condiciones de centrifugado fueron diferentes velocidades, entre 8500 y 9000 rpm durante 10 minutos, se llevaron a cabo 6 repeticiones.

6.2 Funcionalización de plataformas de carbón

6.2.1 Nanopartículas de iridio soportadas en plataformas de carbón

Primero se precalienta etilenglicol a 80°C , una vez se llevó a una temperatura constante se agregaron 800 mg de la nanoestructura de carbono, iniciando con carbono vulcan en una relación de 80% con respecto a la sal de Iridio. Una vez agregada la nanoestructura se añadieron 200 mg de IrCl_3 y finalmente 101.361 mg de NaBH_4 . La reacción se llevó a cabo durante 1 hora manteniendo la solución en agitación constante a 80°C . El proceso efectuado fue el mismo para las demás nanoestructuras, MWCNT y CNF.

6.3 Caracterización fisicoquímica

6.3.1 Microscopía electrónica de Barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido se utilizó para estudiar la morfología de las muestras de IrO_2NP 's sintetizadas previo a su inmovilización; así como la morfología de las muestras de las nanoestructuras de carbón funcionalizadas, lo cual permite el estudio de la interfaz formada entre los materiales y proporciona una idea de los sitios activos que quedan

disponibles para el correcto transporte de masa por el electrodo para llevar a cabo las reacciones correspondientes al metabolismo de amoníaco.

6.3.2 Difracción de Rayos X (XRD)

Es una técnica que otorgó información cristalográfica del material, a través de la cual se identificaron las fases presentes y predominantes en el complejo Carbono / IrO₂NP's, así como nos permitió comparar de manera bibliográfica las nanopartículas sintetizadas con respecto al material del que fueron sintetizadas y se esperaba obtener.

6.4 Inmovilización enzimática

La inmovilización se llevó a cabo a través de la adsorción física de la enzima ureasa sobre las plataformas tras la preparación de tintas catalíticas, proceso durante el cual se llevó a cabo la funcionalización de las plataformas de carbono sintetizadas libremente, como se describe en la sección 6.1.1.

6.4.1 Preparación de tintas catalíticas

Se desarrollaron 3 tintas catalíticas, cada una correspondiente a una nanoestructura de carbono. Las tintas fueron desarrolladas con Nafion al 5% (Sigma Aldrich), buffer de fosfatos de pH 7.0, solución de ureasa de 1 mg/mL y una cantidad de las plataformas de carbono funcionalizadas (**Figura 6.2**). Una vez agregados todos los reactivos la solución de tinta se agitó a una velocidad de 10 rpm en vórtex durante 10 segundos. Las tintas debieron ser almacenadas a -2°C para evitar la desnaturalización de la enzima a largo plazo.

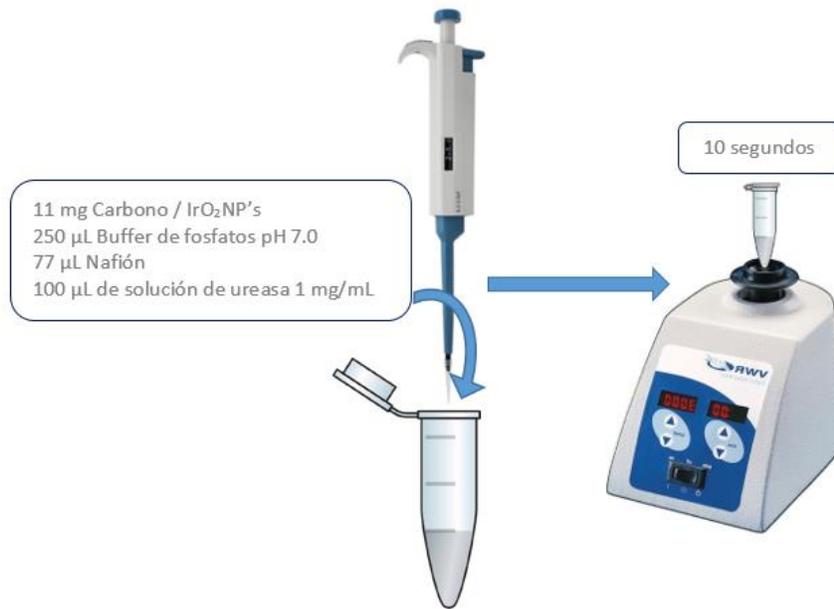


Figura 6.2 Reactivos y proceso de preparación y homogenización de solución en la preparación de tintas catalíticas.

6.4.2 Prueba de acoplamiento enzimático

Determinación de proteína. La cantidad de enzima que se inmovilizó en la superficie de las plataformas de carbón y aquella que reaccionó con las nanopartículas de iridio, fue determinada por medio de la cuantificación de proteínas totales (método de Lowry), realizando una cinética de acoplamiento de la enzima. La cantidad de enzima inmovilizada sobre las plataformas de carbón nanoestructurado fue determinada a través de la cuantificación total de proteína por método de Lowry es un método que se realizó a través una cinética de acoplamiento en un intervalo de una hora, correspondiente a las condiciones de reacción utilizadas durante la síntesis del sistema de nanopartículas decoradas sobre las diferentes nanoestructuras de carbono.

Dicho método es representado en la **Figura 6.3**, el método de Lowry se caracteriza por el uso de Folin – Ciocalteu como reactivo que presenta una coloración azul más intensa dependiendo de la cantidad de proteína presente, su valor de absorbancia fue medido a través

de un espectrofotómetro UV-Vis y la concentración fue calculada haciendo uso de la ley Lambert-Beer.

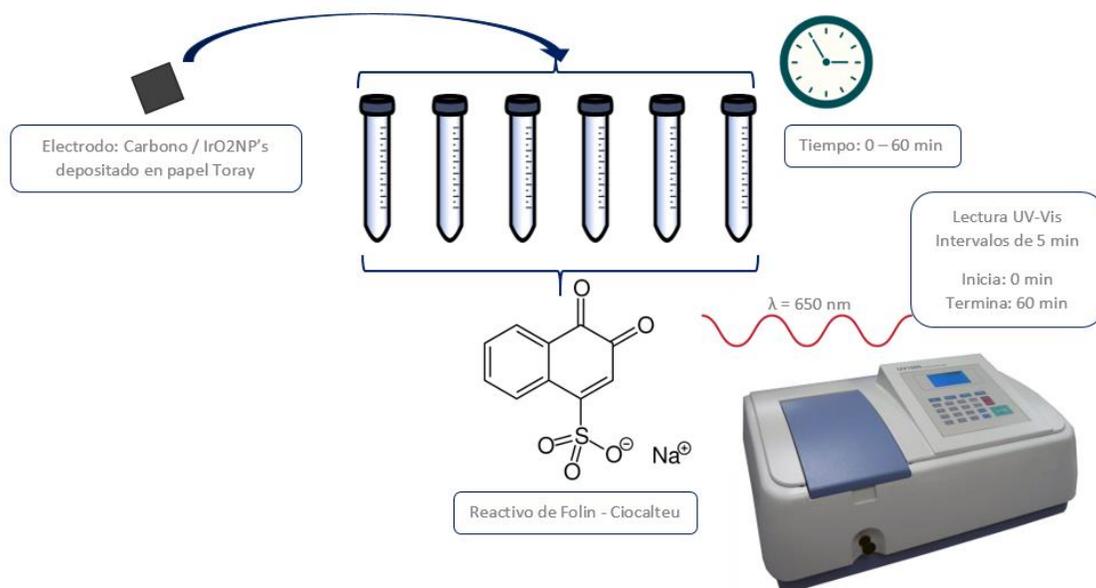


Figura 6.3. Esquema del proceso de experimentación para la determinación del acoplamiento enzimático / inmovilización de ureasa sobre el electrodo de carbono funcionalizado con nanopartículas.

6.4.3 Ciclos de reuso

Inicialmente se preparan soluciones de urea con reactivo de Nessler, se colocan en tubos de ensayo 2.5 mL de solución de urea 64 mM y 1 mL de reactivo Nessler, se almacenaron en una región completamente oscura, posteriormente se crearon 3 electrodos diferentes para cada una de las plataformas de carbono utilizadas, con la finalidad de que el análisis sea por triplicado y se sumergieron en los tubos por 15 minutos, posteriormente se tomaba lectura de las 3 soluciones a una longitud de onda de 425 nm, se retira el electrodo de la solución y se almacenan bajo las condiciones respectivas. El proceso se llevó a cabo durante 15 días, previos a que se alcanzara el tiempo de vida media del electrodo. Los electrodos fueron almacenados a una temperatura de -2°C cada día posterior al proceso de interacción con la solución de urea.

6. 5 Evaluación del efecto de la inmovilización

Ensayo enzimático para medición de actividad de ureasa: Los reactivos utilizados para el ensayo de la enzima fueron reactivo de Nessler (NCR) solución de estándar de amonio (Amm Std.) Se prepararon 75 ml de NCR utilizando una dilución de ficol en agua desionizada (**Figura 6.4**). La solución de amonio fue preparada utilizando sulfato de amonio con agua desionizada como solvente.

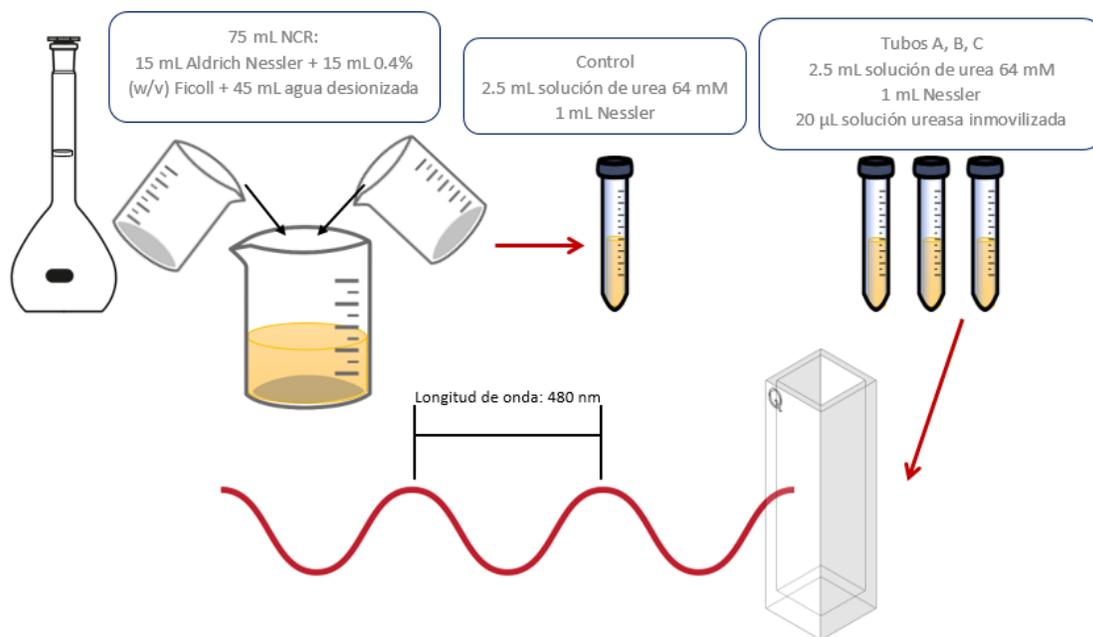


Figura 6.4. Esquema del método de Nessler, utilizado para las pruebas bioquímicas de enzima inmovilizada.

6.5.1 Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad catalítica.

Para evaluar el efecto del pH sobre la actividad catalítica de la ureasa soluble e inmovilizada, se realizaron pruebas de actividad utilizando un rango de pH de 3-10 a 25 ° C. Se utilizaron varias soluciones acuosas: glicina (10 mM) para pH 3-4, acetato fosfato (10 mM) para un rango de pH de 4.5-6, tampón fosfato (NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 10 mM) y tampón Tris (10 mM) para el rango de pH de 6.5-8 y 8-10, respectivamente. El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática se evaluó en un rango de 15 - 65 ° C.

6.5.1.1 Ensayo de actividad de ureasa.

La actividad catalítica enzimática de la ureasa libre e inmovilizada se determinó utilizando un método espectrofotométrico basado en el método Nessler, donde por medio de la cuantificación de amonio producido por la reacción enzimática se logró evaluar la actividad de la enzima.

6.6 Caracterización electroquímica

Las pruebas electroquímicas conducidas corresponden a voltamperometrias cíclicas y voltametrías de pulso diferencial utilizando el equipo Gamry Instruments Reference 3000. Como parámetros generales, se utilizó buffer de fosfatos de pH 7.0 como electrolito soporte y para la preparación de soluciones de urea; se utilizó un pH neutro debido a que la enzima ureasa posee una excelente actividad a pH 7. Se prepararon soluciones con diferentes concentraciones de urea en el rango de 1 mM a 100 mM.

Las voltametrías cíclicas se llevaron a cabo en una ventana de potencial que variaba linealmente de -1.5 a 1.5 V frente un electrodo de Ag/AgCl, KCl (0.1M), para las voltametrías de pulso diferencial se varió el potencial hasta 1.7 V variando los parámetros de velocidad y pulsos con respecto al voltaje. Se utilizaron las tintas preparadas como se explica en la sección 6.4.1 cómo depósito para un electrodo de trabajo de carbón vítreo.

6.6.1 Pruebas electroquímicas sobre actividad catalítica

La evaluación de la actividad enzimática se realizó mediante voltametría cíclica y voltametría de pulso diferencial en una celda electroquímica convencional de 3 electrodos, útil para la determinación y sensado de urea en solución tampón, obteniendo diferentes intensidades de corriente que varían conforme aumenta la concentración de urea. Las plataformas de carbón funcionalizadas se utilizaron como electrodo de trabajo, una barra de grafito como contraelectrodo y un electrodo de referencia de Ag/AgCl, KCl (0.1M). Como se menciona en la sección anterior, se emplea urea en soluciones tampón como electrolito a

diferentes concentraciones en un rango que varía en saturación de 1 mM a 100 mM. Por otro lado, la estabilidad de los electrodos desarrollados se evaluó realizando la caracterización electroquímica una vez a la semana durante un mes.

6.7 Pruebas en celda de combustible

Para un estudio del potencial y la energía química producida a través de transporte electrónico por la reacción REDOX ocasionada por las nanopartículas con el subproducto de amoníaco de la reacción de hidrólisis de la urea se utilizaron celdas construidas con papel Whatman y electrodos correspondientes al cátodo y el ánodo, que poseen tinta catalítica depositada sobre papel toray.

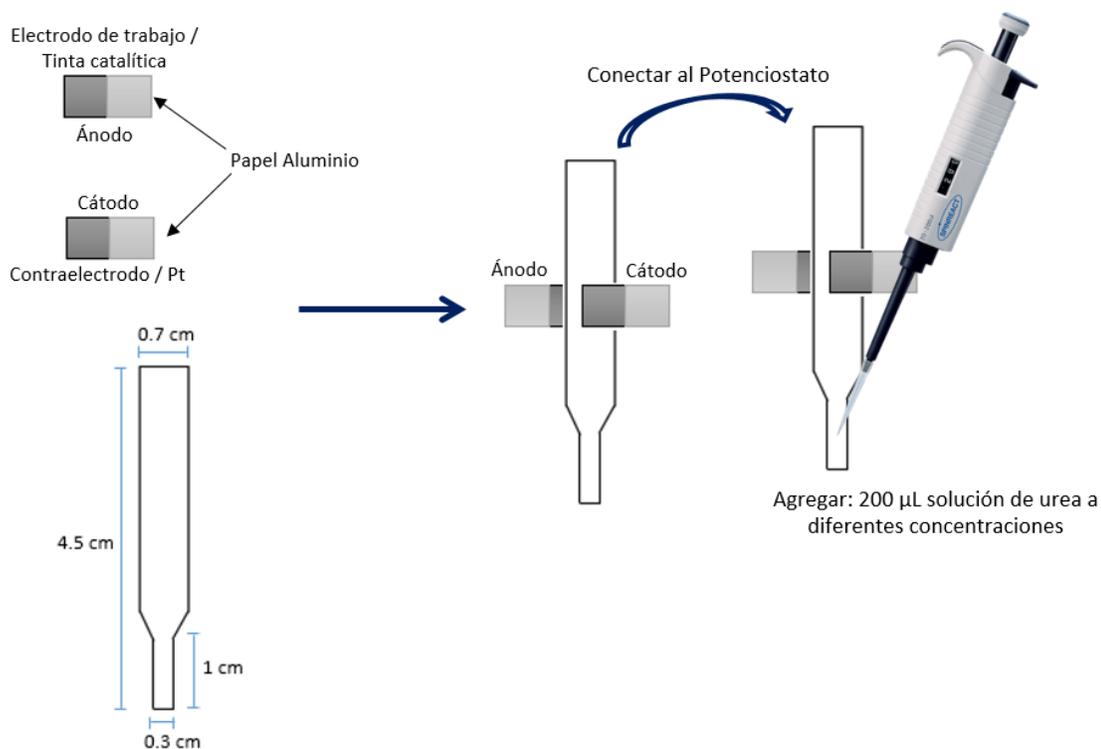


Figura 6.5. Esquema del diseño y elaboración de una celda de combustible microfluídica basada en papel de un solo canal.

Se prepararon 4 soluciones de urea con concentraciones de 1, 10, 30 y 64 mM, las celdas fueron evaluadas con cada una de las soluciones, se cortó papel Whatman con dimensiones

de 4.5 cm de largo, 0.7 cm de grosor y 0.3 cm de grosor de canal de flujo con longitud de 1 cm (**Figura 6.5**). La tinta depositada sobre los electrodos corresponde a cada una de las nanoestructuras de carbono funcionalizadas y con enzima inmovilizada; las dimensiones del papel toray son de 1 x 0.5 cm y la mitad es cubierta con papel aluminio, que corresponde a la sección que se conecta con el potencióstato.

7. Resultados y discusión

7.1 Pruebas de Caracterización

Caracterización de IrO₂NP's

Las caracterizaciones físicas del material sintetizado para su estudio en este proyecto nos permiten conocer algunas de sus propiedades como morfología, composición química, tamaño de partícula y propiedades cristalográficas.

7.1.1 Microscopía electrónica de Barrido (SEM)

Es de principal interés para conocer la morfología de las IrO₂NP's, en las micrografías podemos observar el material sintetizado antes y después de ser funcionalizadas en la superficie de las plataformas de carbono, lo cual nos permite observar la morfología existente en la interfaz del material, dándonos una idea de la forma en que los sitios activos quedan expuestos para tanto la inmovilización de la enzima ureasa, así como para la oxidación del amoníaco.

A) Nanopartículas de Iridio

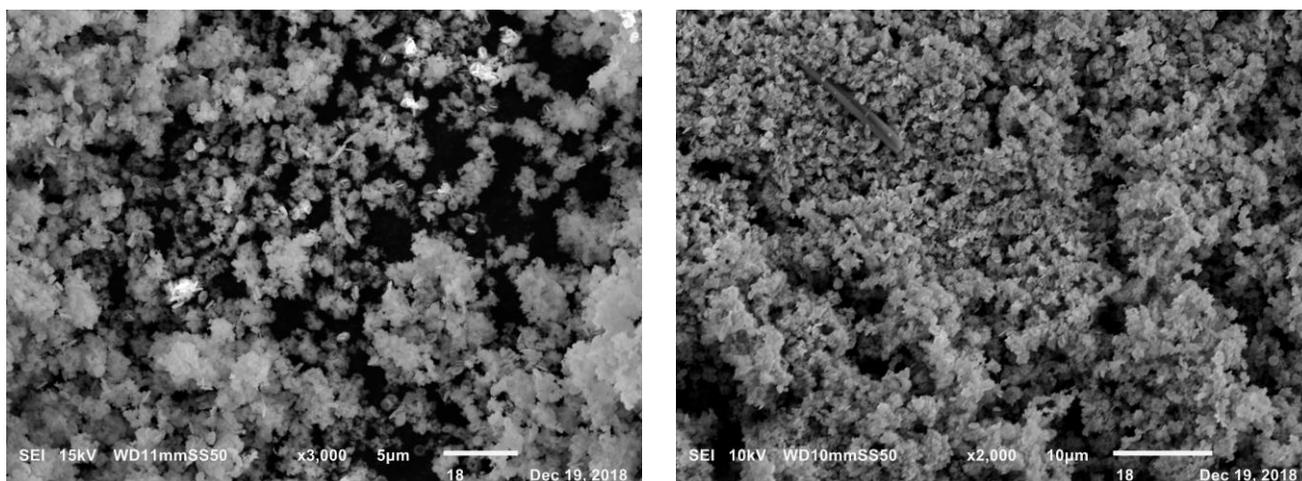


Figura 7.1. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de las IrO₂NP's libres sintetizadas por método químico.

En la **Figura 7.1** se puede observar una morfología esférica de nanopartículas nanométricas que presentan aglomerados. Dichas nanopartículas fueron sintetizadas sin sustrato, es decir, sin el apoyo de una nanoestructura, por lo cual son libres y no se encuentran decoradas sobre superficie alguna. En el inciso A se observan las nanopartículas con una magnificación de 3000X y un voltaje de aceleración de 15kV, es por esto que se alcanzan a apreciar más pequeñas partículas esféricas de alrededor de 0.5-1 μm en sus respectivos cúmulos, mientras que en el inciso B al tener una magnificación de 2000X no se percibe una clara separación de las partículas, sin embargo, se aprecia que existe una gran cantidad de las mismas.

B) Sistema MWCNT / $\text{IrO}_2\text{NP}'\text{s}$

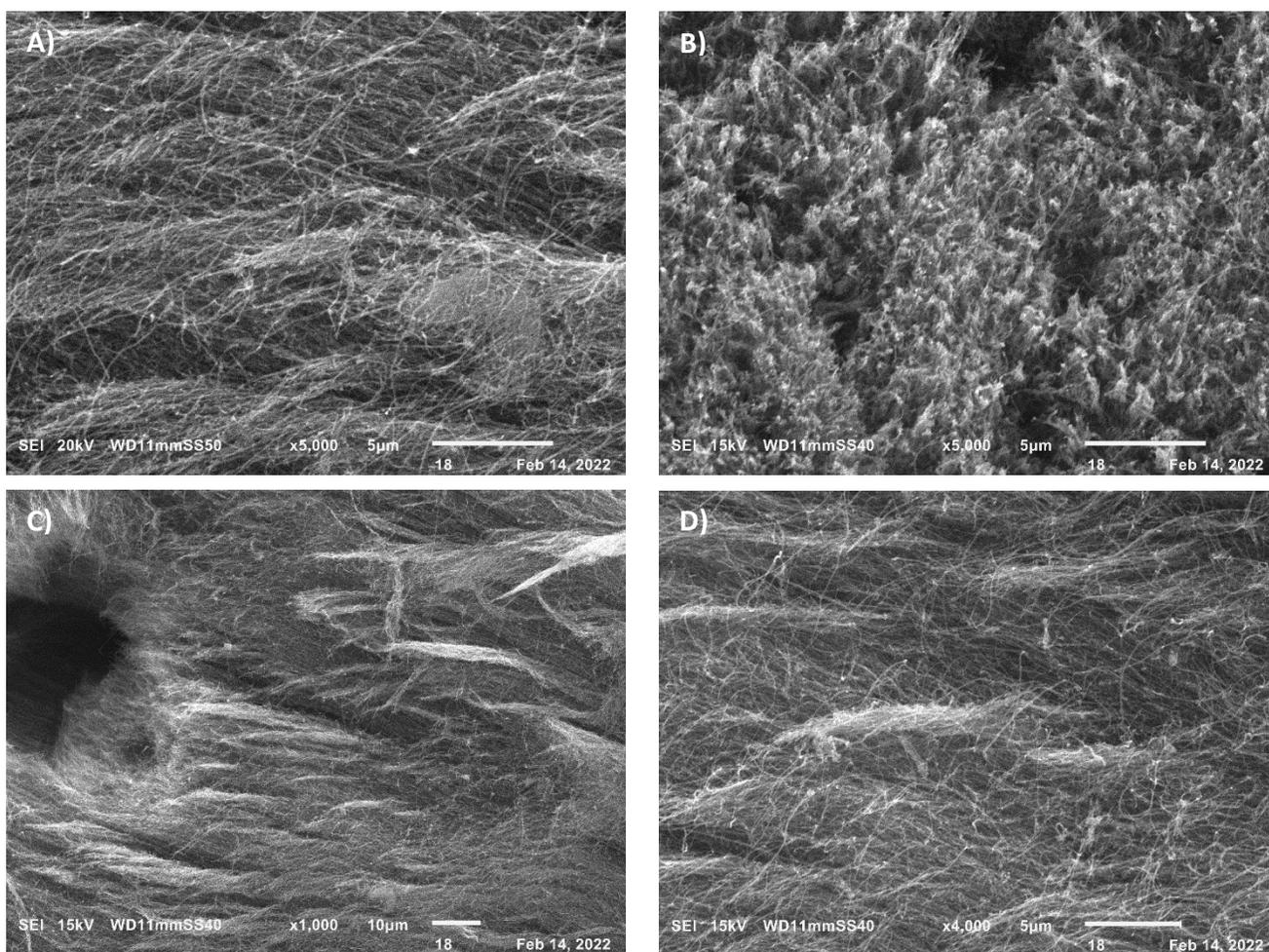


Figura 7.2. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) del sistema MWCNT decorado con $\text{IrO}_2\text{NP}'\text{s}$ sintetizadas por método químico.

Los resultados observados en las micrografías obtenidas a partir de las nanoestructuras decoradas con nanopartículas previo a su uso en electrodo presentan diferencias, se fabricaron bioánodos utilizando tres formas alotrópicas de carbono nanoestructuradas, la primera que se estudió fueron los nanotubos, como se observa en la **Figura 7.2** podemos observar que las nanopartículas se encuentran dispersas sobre la superficie de los nanotubos, sin embargo, no corresponde a un recubrimiento completo de los MWCNT, en su lugar se adhieren únicamente pequeñas partículas a lo largo del material o como se aprecia en la Figura 7.2 B) se forman pequeñas partículas entre los intersticios de los nanotubos; éste inciso el más diferente pues se logró obtener una imagen que muestra un arreglo diferente en los nanotubos, vistos desde otro ángulo. En los incisos A, C y D se pueden observar los nanotubos con partículas a lo largo de su superficie, el inciso A posee una magnificación de 5000X mientras el inciso D una de 4000X siendo los resultados mejor observables.

En la **Figura 7.3 A** se observan las nanofibras con un aumento de 450, a lo largo de la misma se observa la adhesión de algunas nanopartículas, que se aprecian como puntos blancos muy pequeños, en las **Figuras 7.3 B y 7.3 C** se observa como las nanopartículas parecen adherirse formando una capa fibrilar y no aglomerados, más bien, se encuentran repartidas a lo largo de la nanoestructura.

C) Sistema CNF / IrO₂NP's

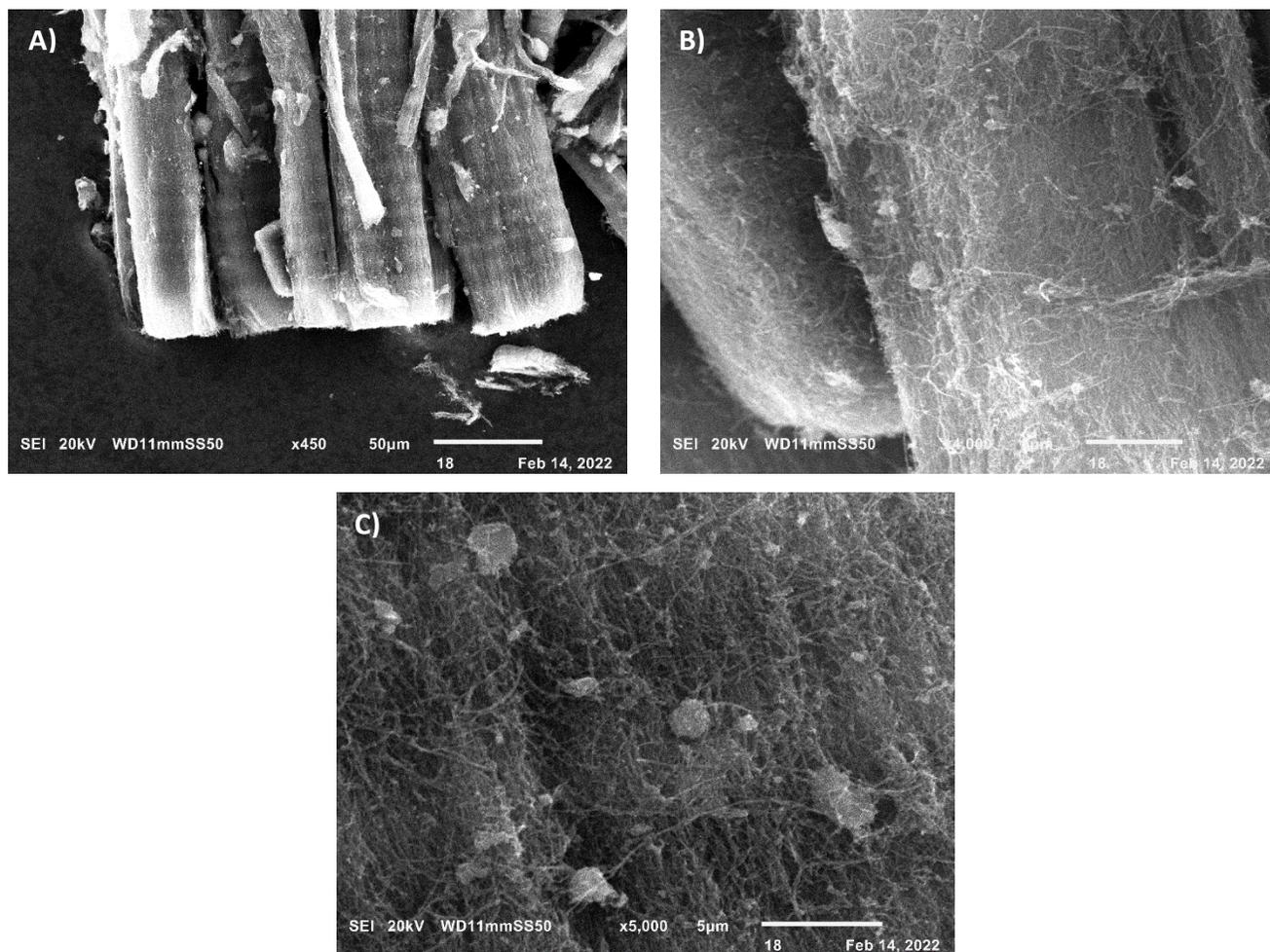


Figura 7.3. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) del sistema CNF decorado con IrO₂NP's sintetizadas por método químico.

Comparando las **Figuras 7.2** y **7.3** podemos observar las diferencias en la morfología y el tamaño de los MWCNT y las CNF, siendo éstas últimas las de un diámetro mayor, por lo cual no se les puede considerar completamente nanoestructuras, pues su tamaño es mayor a los 100 nm, sin embargo, la decoración con IrO₂NP's es más homogénea y observable, pues se aprecia con mayor fidelidad como las NP's esféricas son funcionalizadas en la superficie por atrapamiento en una red fibrilar.

D) Sistema Vulcan / IrNP's

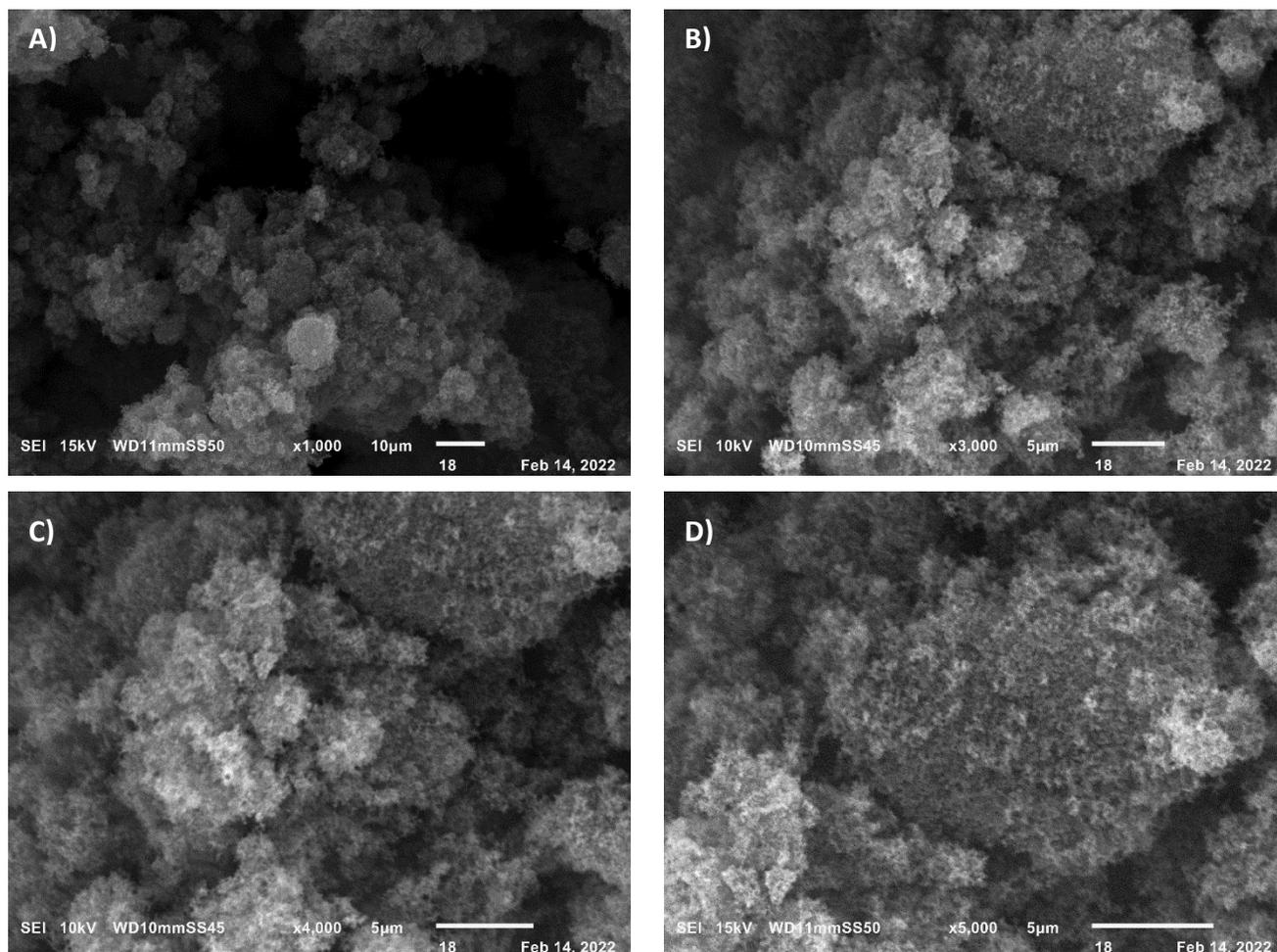


Figura 7.4. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) del sistema Vulcan decorado con IrNP's sintetizadas por método químico.

En la **Figura 7.4** se muestran las diferentes micrografías obtenidas para las IrNP's decoradas sobre carbón vulcan, el cual, a diferencia de los MWCNT y las CNF es un material nanoparticulado, podemos observar cómo se forma un aglomerado de carbón vulcan con nanopartículas de iridio cuyos diámetros varían en el rango de los nanómetros y un aproximado de 7 micrómetros, como se observa en la **Figura 7.4 A**.

7.1.2 Difracción de Rayos X (XRD)

En la **Figura 7.5** se puede observar los análisis de XRD y los planos cristalinos de los materiales; de principal interés es identificar las reflexiones de Bragg características del iridio y/o dióxido de iridio para poder determinar con que material estamos trabajando, así como el resultado de la síntesis de las $\text{IrO}_2\text{NP's}$ sobre su respectivo soporte y como este puede fungir como intermediario en la reacción. La información de los difractogramas usados como referencia mostrada en las figuras formadas por los difractogramas sobre el iridio e IrO_2 sintetizados fue obtenida de Materials Project (<https://materialsproject.org/materials/mp-2723>).

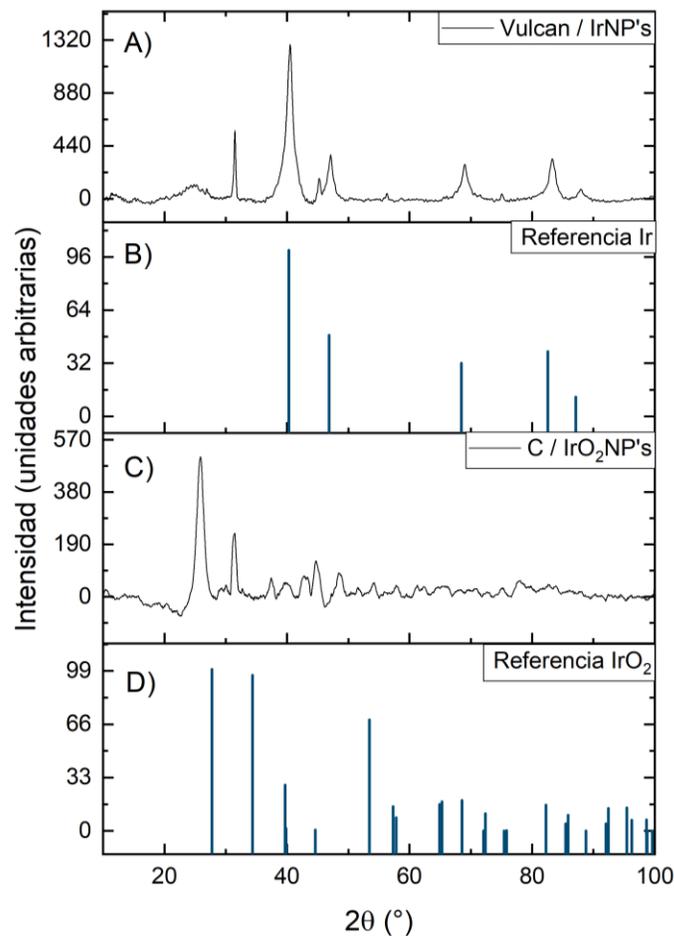


Figura 7.5. Difractogramas de rayos X obtenidos de los sistemas sintetizados, comparados con los difractogramas de Iridio (B) y Dióxido de Iridio (D) obtenidos de Materials Project.

En la **Figura 7.5**, podemos corroborar que la nanoestructura utilizada como sustrato influye en la formación de las nanopartículas, debido a que nos muestra como existen diferentes tipos de estructuras al finalizar la síntesis y como las plataformas decoradas con nanopartículas presentan diferencias de carácter cristalino, empezando por los planos preferentes, siguiendo con el tipo de material con que fueron decoradas durante la síntesis, como se mencionó en la sección anterior la sal utilizada como precursor de las nanopartículas fue IrCl_3 , en los difractogramas A) y B) se aprecia que a pesar de que existieran las mismas condiciones de síntesis, la presencia de una nanoestructura de carbono diferente promovió que la funcionalización por decoración de nanopartículas fuera con nanopartículas de iridio para el carbono vulcan y efectivamente de nanopartículas de dióxido de iridio para las nanoestructuras de carbono subsecuentes.

En las siguientes figuras se observa a más detalle una comparación entre el difractograma del material sintetizado con el del material que se buscaba obtener, indicando los planos cristalinos más predominantes.

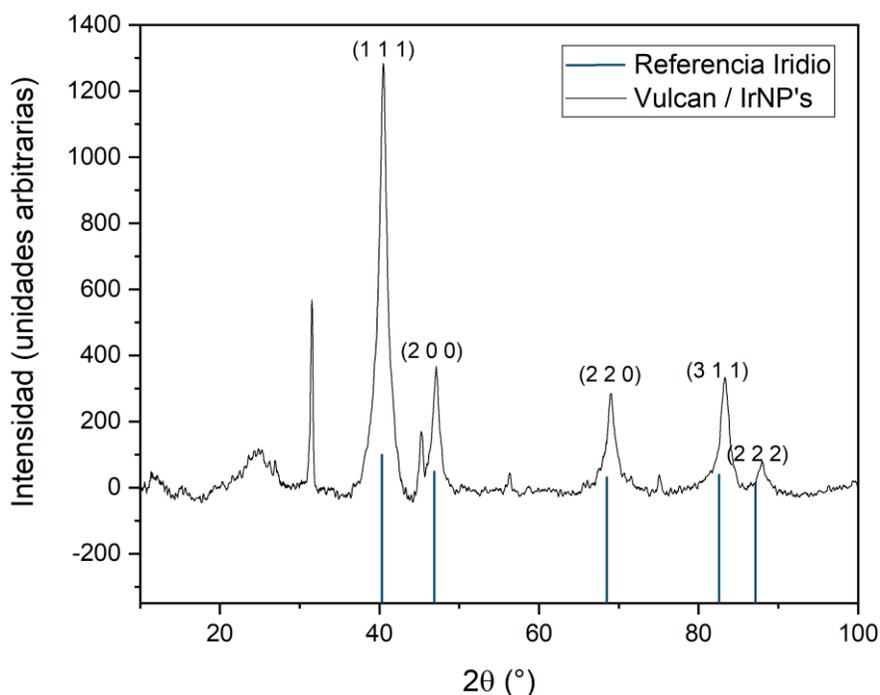


Figura 7.6. Difractogramas de rayos X del electrodo Vulcan/IrNP's comparado con el difractograma del Iridio (Materials Project).

La **Figura 7.6** muestra el patrón de difracción del sistema nanoparticulado sintetizado con carbono vulcan. A diferencia de la referencia, podemos observar que se forman reflexiones de Bragg centradas entre 15° y 30° de 2θ , que pueden ser correspondientes a carbono vulcan que posee una banda ancha centrada en 25° , las reflexiones pueden estar corridas debido a la decoración del mismo con nanopartículas de iridio, que se encuentran cubriendo una parte de la superficie del carbono vulcan.

Podemos corroborar que a diferencia de las otras dos plataformas (MWCNT y CNF) el carbono vulcan provee de una reacción controlada en la que se generan nanopartículas de iridio y no IrO_2 , lo cual se puede deber a la estabilidad formada por el tamaño y forma del carbono, que es un producto nanoestructurado. Las reflexiones correspondientes al iridio son casi iguales a las reportadas en la literatura, con intensidades mucho mayores en el producto sintetizado en las que se observan las dos reflexiones principales en 40° y 47° teniendo mayor predominancia el plano 1 1 1 característico del iridio. No existe una alteración en el crecimiento del plano preferencial, simplemente se corrobora la formación de nanopartículas correspondientes a un material en específico, en este caso, iridio.

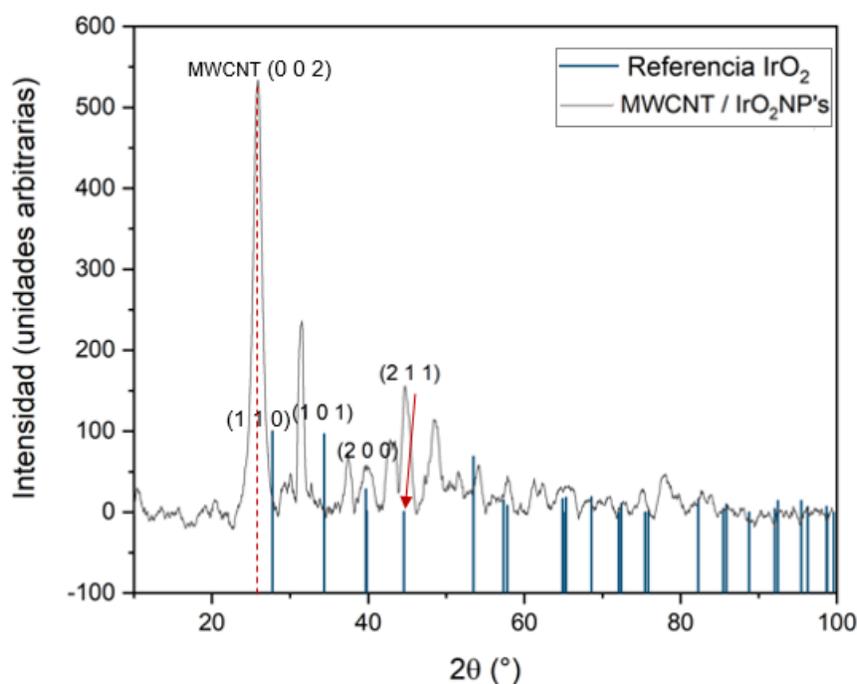


Figura 7.7. Difractogramas de rayos X del electrodo MWCNT/ IrO_2 NP's comparado con el difractograma de Dióxido de Iridio (Materials Project).

En la **Figura 7.7** se pueden observar el difractograma obtenido para el material sintetizado sobre las plataforma de nanotubos de carbono, indicado como MWCNT/IrO₂NP's, y el patrón de referencia para el IrO₂, se aprecia que existe un corrimiento a la izquierda en las reflexiones de Bragg sobre el eje 2θ, así como varias de las bandas no coinciden, sin embargo, en la **Figura 7.8** se reporta el patrón de difracción de MWCNT purificados, en el cual podemos observar la incidencia de las reflexiones de Bragg a las que para uso práctico denominaremos picos. El patrón mostró un pico de difracción intenso alrededor de 2θ = 26°, picos de difracción de baja intensidad alrededor de 44, 53 y 78 que se asignan a (002), (100), (004) y (110), respectivamente; lo anterior corresponde a patrones de difracción de grafito típico (Atchudan, R., Pandurangan, A., & Joo, J., 2015).

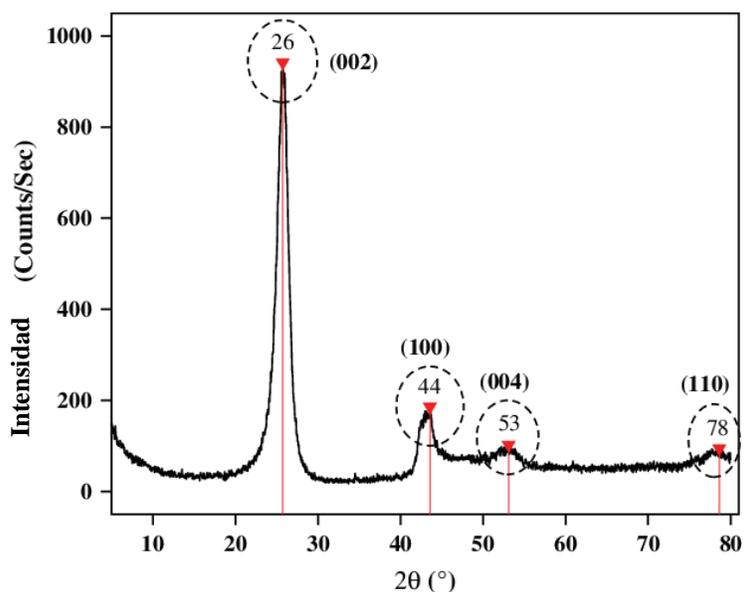


Figura 7.8. Patrón de difracción de rayos X de MWCNT's purificados (Atchudan, R., Pandurangan, A., & Joo, J., 2015).

El patrón obtenido del material (MWCNT/IrO₂NP's) coincide en su mayoría con el reportado por Atchudan, R., no obstante, nuestra plataforma posee un patrón que presenta más ruido que puede provenir de impurezas o partículas metálicas, como las IrO₂NP's, pero el pico más intenso corresponde al de los nanotubos de carbono, por lo cual se asume que las nanopartículas quedan internalizadas en los MWCNT.

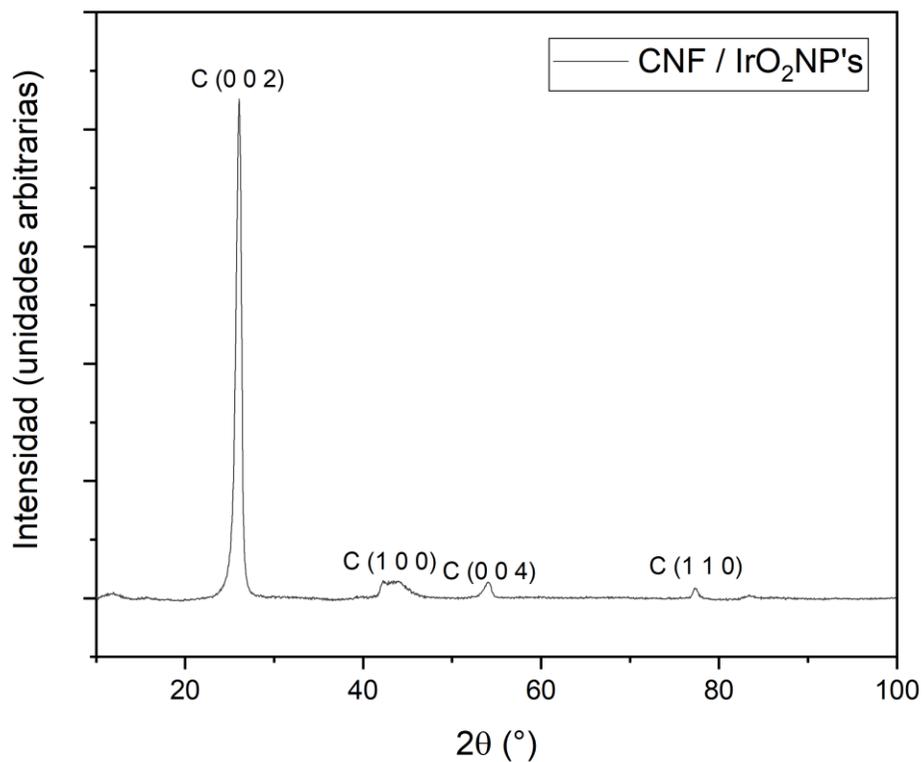


Figura 7.9. Difractograma de rayos X del sistema CNF/IrO₂NP's sintetizado por método químico.

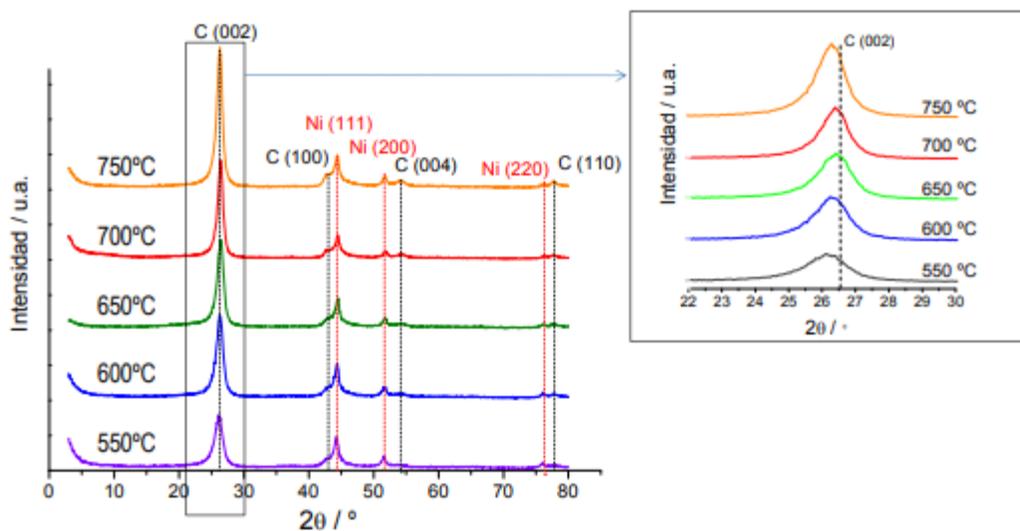


Figura 7.10. Difractogramas de referencia de las CNF en función de diferentes temperaturas de síntesis (del Río, D. S., 2011).

En la **Figura 7.10** se observan difractogramas obtenidos por del Río, D.S. en los que la reflexión del C (002) es el más intenso de los picos del carbono.

En comparación con las CNF utilizadas, el difractograma de la **Figura 7.9** presenta un patrón muy similar, característico del carbono, sin que se aprecie la existencia de una reflexión característica del iridio o dióxido de iridio, debido a esto se puede asumir que una vez cumpliendo su función de oxidar el amoníaco, el iridio estará presente pero no se encontrará en la superficie del sistema, más bien se encontrará encapsulado y/o cubierto en las nanofibras de carbono, a diferencia de como sucede con los otros sistemas, en los cuales se encuentra funcionalizado / decorado en la superficie de los mismos.

7.2 Evaluación Enzimática

7.2.1 Ensayo de actividad de la ureasa

De acuerdo con el análisis de pH de la enzima ureasa libre, encontramos que posee mayor actividad entre 6.25 y 7.25, siendo el óptimo reportado de 7.4, debido a esto podemos considerar adecuado trabajar con un pH en el rango mencionado, siendo el seleccionado un pH neutro, de 7.0, debido a la posibilidad de aumento en el mismo valor conforme se lleva a cabo la reacción. De acuerdo a la literatura, es bien sabido que los aumentos de temperatura aceleran las reacciones químicas, concepto aplicado también a las reacciones catalizadas por enzimas, catalizadores biológicos.

A través de los resultados de la podemos determinar las condiciones óptimas para elaborar el sensor y en las cuáles se pueden llevar a cabo los estudios posteriores, siendo que se delimitan condiciones de trabajo. Dependiendo de la concentración de sustrato variará la cinética de Michaelis Menten.

En la **Figura 7.11** se muestra la estabilidad de la enzima libre como inmovilizada, los patrones son similares entre sí, cambiando principalmente la actividad enzimática residual; los MWCNT permiten mayor actividad enzimática al variar la temperatura en comparación

con las otras nanoestructuras, siendo las CNF las que permiten menor actividad enzimática. Al variar el pH, las CNF permiten mayor actividad enzimática que los MWCNT. El Carbón Vulcán se mantiene más constante, permitiéndolo a la enzima inmovilizada a variar el pH como la temperatura. Al ser inmovilizada la enzima pierde actividad.

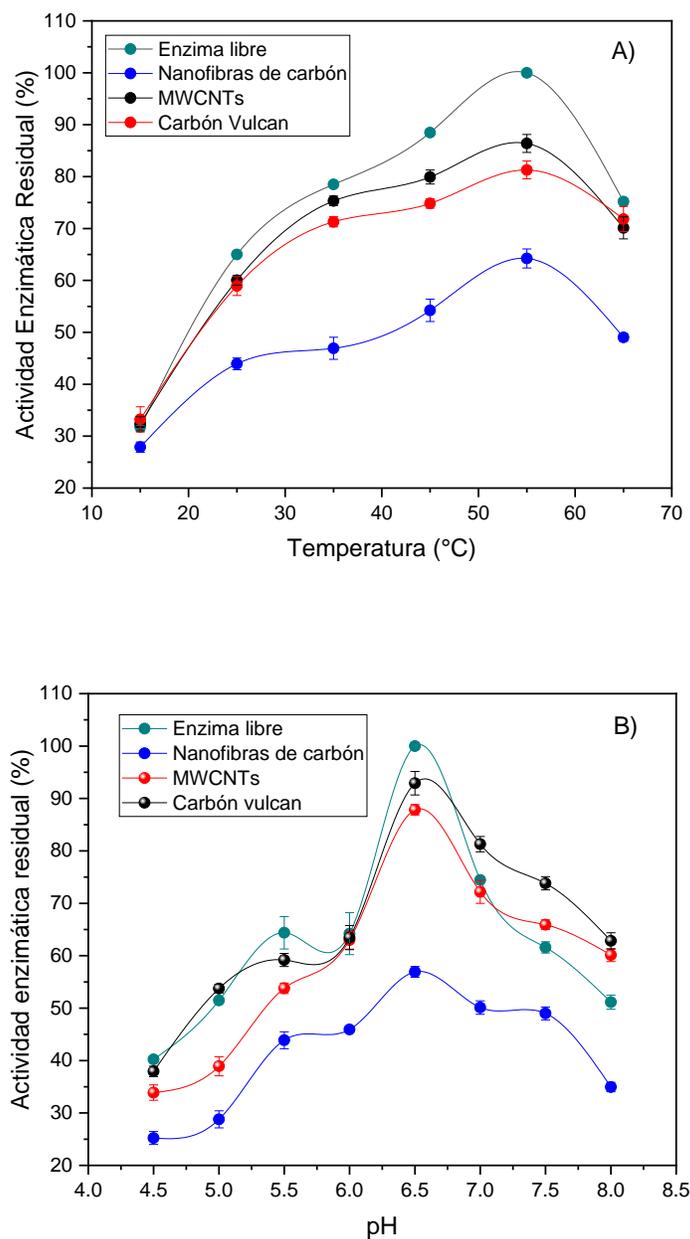


Figura 7.11. Estabilidad de enzima ureasa libre a diferente pH y temperatura, obtenida a través de un ensayo de estándar de amonio. Estabilidad enzimática en diferentes condiciones A) Condición de temperatura y B) Condición de p.H.

7.2.2 Acoplamiento enzimático

En la **Figura 7.12** se observan las curvas generadas a partir de la inmovilización de enzima ureasa sobre cada una de las 3 plataformas de carbón discutidas en secciones previas, se observa claramente que la nanoestructura con mayor efectividad es el carbón vulcan, debido a que durante los primeros 25 minutos de reacción se logró inmovilizar aproximadamente el 78% de la enzima total en solución, de las tres estructuras la peor efectividad en el acoplamiento corresponde a las CNF, debido a que transcurridos 45 minutos únicamente se logró inmovilizar aproximadamente un 40% de la enzima en solución, porcentaje al cual se estabilizó, los MWCNT por su parte toman más tiempo en estabilizar la cantidad de enzima que se acoplan a su superficie, pues les tomó 55 minutos inmovilizar aproximadamente el 63% de la enzima en solución.

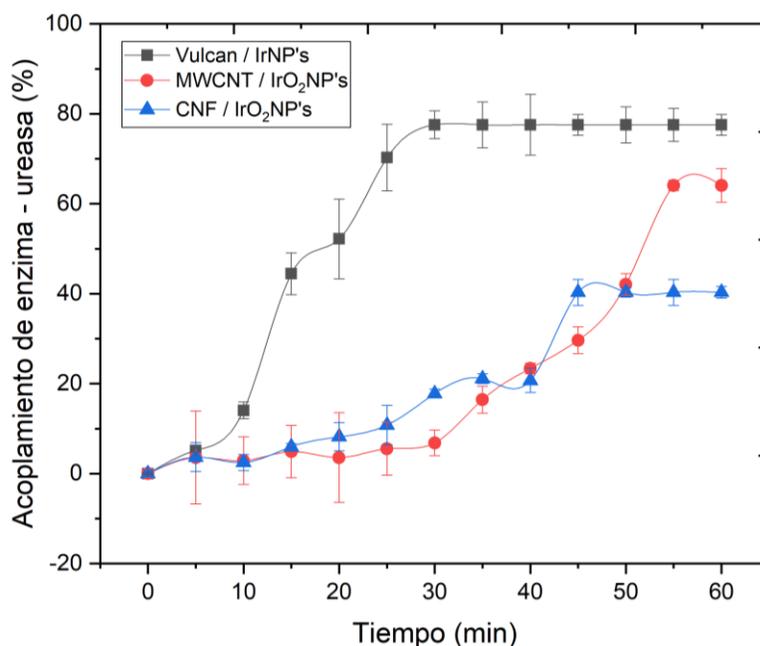


Figura 7.12. Resultados de inmovilización enzimática. Curvas de acoplamiento de enzima ureasa sobre las diferentes plataformas de carbón nanoestructuradas funcionalizadas con IrO₂NP's.

La inmovilización enzimática puede variar, existe la posibilidad de que el conteo proteico en solución variara debido a condiciones y factores externos, como la temperatura, pues a pesar de haber tomado en cuenta las condiciones óptimas para trabajar con ureasa, cómo se explica en la página anterior, la temperatura a la que la enzima presentó mayor actividad es mayor a

la temperatura ambiente por poco más de 20 °C y aproximadamente 55 °C mayor a la temperatura de almacenamiento de la enzima.

Es importante aclarar que la cantidad total de enzima en solución no es inmovilizada efectivamente, es decir, no existe un rendimiento del 100%, este proceso es apoyado por las nanopartículas de iridio / dióxido de iridio, debido a que a través de la funcionalización se tiene la menor pérdida posible de bioreceptor.

7.2.3 Ciclos de reúso

La generación de ciclos de reuso permite estudiar el tiempo de vida de un biosensor, en este caso, el tiempo que el electrodo funcionará correctamente y seguirá teniendo actividad enzimática ligada a los sistemas de carbón funcionalizado con nanopartículas.

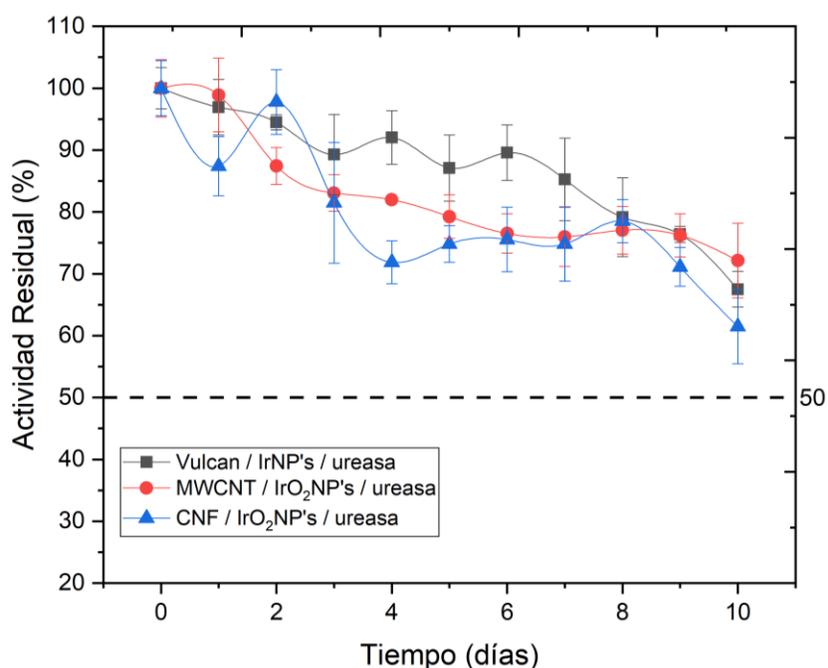


Figura 7.13. Ciclos de reúso de los electrodos enzimáticos, evaluando la actividad residual de la enzima ureasa en un lapso de 10 días.

En la **Figura 7.13** una gráfica correspondiente a la actividad residual enzimática en un tiempo de 10 días para el análisis previo al tiempo de vida medio de los sistemas enzimáticos, se alcanza a observar que los sistemas no alcanzan su vida media durante este periodo, sin embargo, los resultados contrastan con los encontrados en las pruebas de acoplamiento, pues

a pesar de haber inmovilizado una menor cantidad de enzima, el sistema de nanotubos de carbono presentan ligeramente mayor actividad al de carbón vulcan.

7.3 Pruebas electroquímicas de detección de actividad enzimática

Voltametría cíclica: Experimentación ejecutada con una velocidad de barrido de de 50 o 100 mV/s en una ventana de -1 V a 1.5 V vs Ag/AgCl, en ocasiones aumentando los valores de la ventana de potencial hasta 2 V. Se analizó el rango de oxidación, estudiado a través de la aparición de una señal anódica, lo anterior nos fue útil para delimitar los valores de la DPV (Voltametría de pulso diferencial).

Voltametría de pulso diferencial: Las pruebas se llevan a cabo por triplicado para generar un rango y ajuste de los resultados obtenidos. Se corren las pruebas en una ventana de potencial de 0.5 V a 1.5 V vs Ag/AgCl, generalmente ajustando los valores hasta 1.25 V, potencial al cual la señal anódica ya ha aparecido.

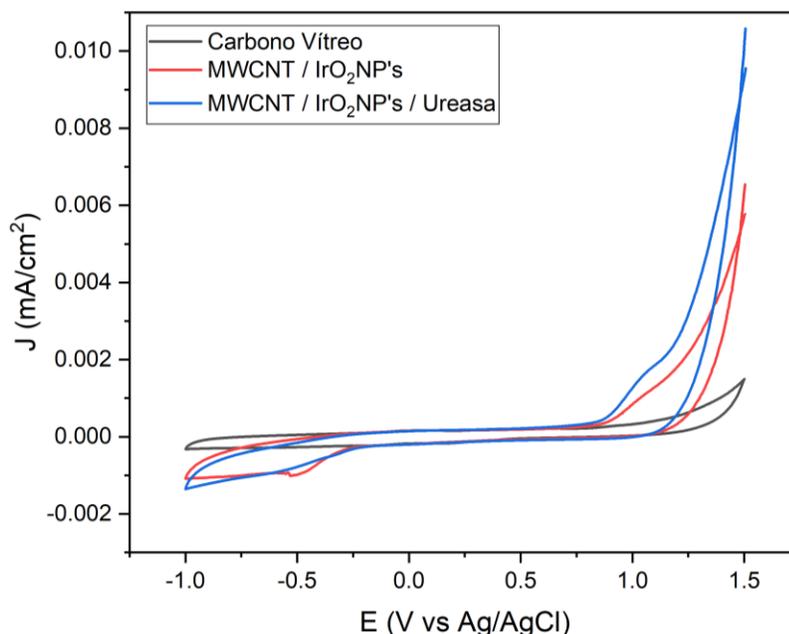


Figura 7.14. Voltametría cíclica (CV) del electrodo propuesto de nanotubos de carbono de pared múltiple decorado con IrO₂NP's y ureasa inmovilizada en una solución de urea 10 mM graduada con tampón pH 7.0 contra una curva de control de carbono vítreo y el material sin inmovilización enzimática.

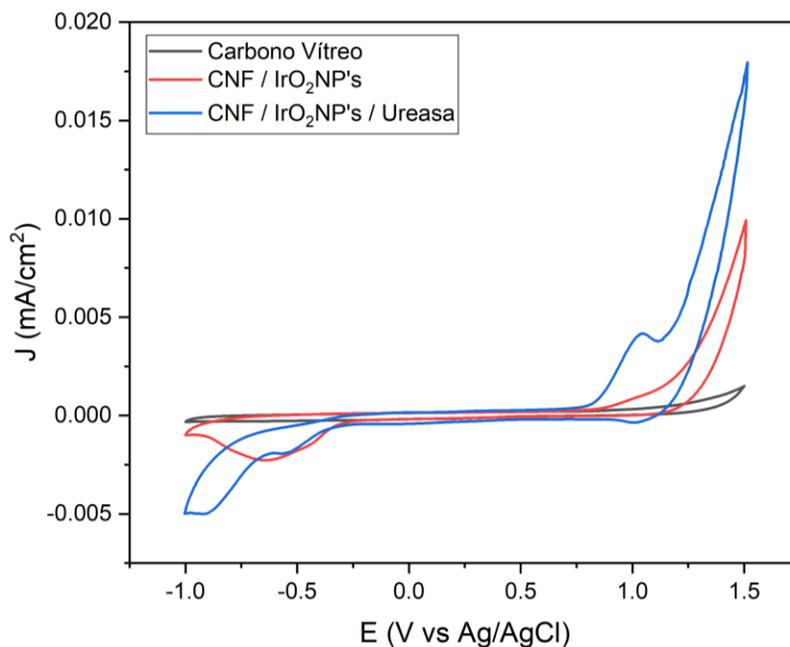


Figura 7.15. Voltametría cíclica (CV) del electrodo propuesto de nanofibras de carbono decorado con IrO₂NP's y ureasa inmovilizada en una solución de urea 10 mM graduada con tampón pH 7.0 contra una curva de control de carbono vítreo y el material sin inmovilización enzimática.

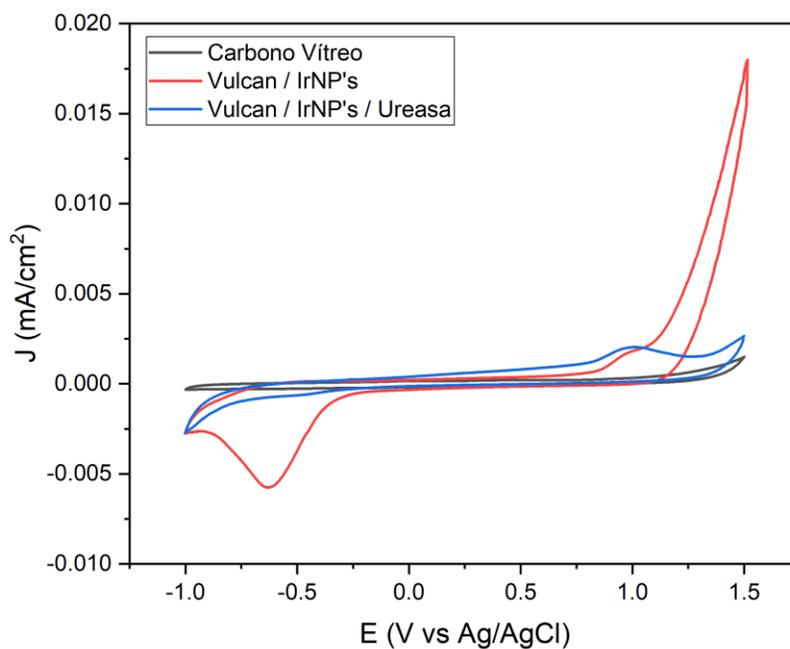


Figura 7.16. Voltametría cíclica (CV) del electrodo propuesto de carbón vulcan decorado con IrNP's y ureasa inmovilizada en una solución de urea 10 mM graduada con tampón pH 7.0 contra una curva de control de carbono vítreo y el material sin inmovilización enzimática.

Las voltametrías cíclicas de control para una solución de urea 10 mM aplicadas con un electrodo de carbón vítreo modificado para los sistemas MWCNT / IrO₂NP's / ureasa, CNF / IrO₂NP's / ureasa y Vulcan / IrNP's / ureasa se muestran en las **Figuras 7.14, 7.15 y 7.16**, respectivamente. Se puede observar la formación de un pico anódico en el potencial de 1 V en los ciclos de color azul, que corresponden a la reacción de oxidación precursora del análisis de la reacción de hidrólisis de la urea catalizada por la enzima en estudio. En voltamperogram de color rojo se muestra el comportamiento del electrodo sin enzima donde no se puede observar la señal anódica de la oxidación de la urea.

Es importante destacar que la modificación del electrodo de carbón vítreo con el sistema formulado produce un análisis de detección de urea apoyándonos en diferentes reacciones, pues las nanopartículas llevan a cabo la oxidación del subproducto de la reacción de hidrólisis (amoníaco), dicha oxidación debe ser apreciada a través de una señal anódica, lo cual nos indica la presencia de urea en el electrolito.

Se puede demostrar que es necesario tener un arreglo del electrodo donde lleve a cabo una reacción acoplada, donde por medio de la ureasa que es una enzima hidrolítica pueda generarse el producto que servirá como reactivo para las nanopartículas de óxido de iridio, donde de esta forma se produzca la oxidación que puede observarse en el pico anódico de los voltamperogramas a potenciales arriba de 1V.

La electrooxidación de amoníaco ha llamado mucho la atención en los últimos años; sin embargo, la aplicación de este proceso a gran escala se ha visto muy obstaculizada debido a la baja eficiencia. Los retos que presenta esta tecnología son principalmente aumentar la velocidad de la cinética de la electrooxidación del amoníaco, ya que por ahora es muy lenta, debido a la naturaleza irreversible de las reacciones. Debido a las limitaciones cinéticas de la electrooxidación de amoníaco, se necesita un potencial muy alto (Zhong *et al.*, 2013).

7.3.1 Sistema MWCNT / IrO₂NP's

Voltametría cíclica

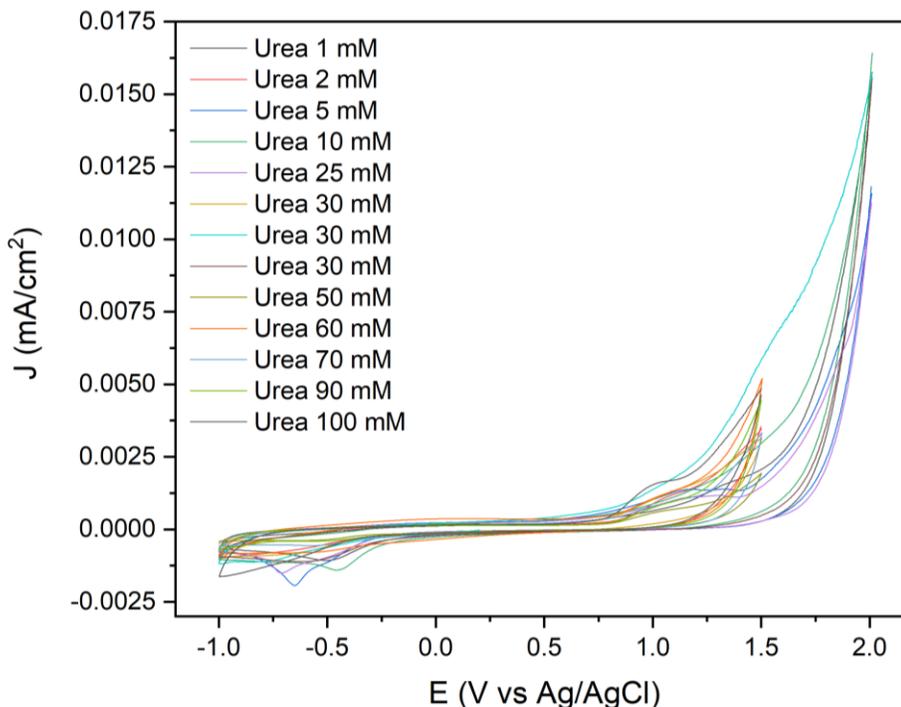


Figura 7.17. Voltametrías cíclicas de electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de MWCNT/IrO₂NP's para soluciones de urea a diferentes concentraciones, de 1 mM a 100 mM.

En las **Figuras 7.17** y **7.18** se muestran las voltametrías cíclicas generadas con el uso del sistema MWCNT / IrO₂NP's / ureasa, se optó por llevar a cabo análisis en diferentes ventanas de potencial, entre -1 y 1.5 V vs Ag/AgCl y la otra llegando hasta 2 V vs Ag/AgCl, en ambas se observa la aparición de una señal anódica alrededor de un potencial de 1 V. En la literatura se reporta el uso de electrocatalizadores IrRh/C soportados en carbono con diferentes proporciones atómicas de iridio a rodio (0:100, 50:50, 70:30, 90:10 y 100:0) para la electrooxidación de amoníaco (AmER) en medios alcalinos. En este estudio se encontró que en todos los voltamogramas excepto en Rh/C, la región del hidrógeno está bien definida entre -0,85 V y -0,6 V, que es una forma típica de voltametría cíclica de Ir/C en medios alcalinos (Silva, J. C. M., et al. 2017), dicha experimentación contrasta con la aparición de una señal en 1 V, pues se asemeja más a la reacción de evolución del oxígeno, sin embargo se hace uso

de contraelectrodos diferentes, mientras que en la teoría se usa un contraelectrodo de Hg/HgO, en este trabajo se hace uso de uno de Ag/AgCl, debido a esto el valor del potencial cambia.

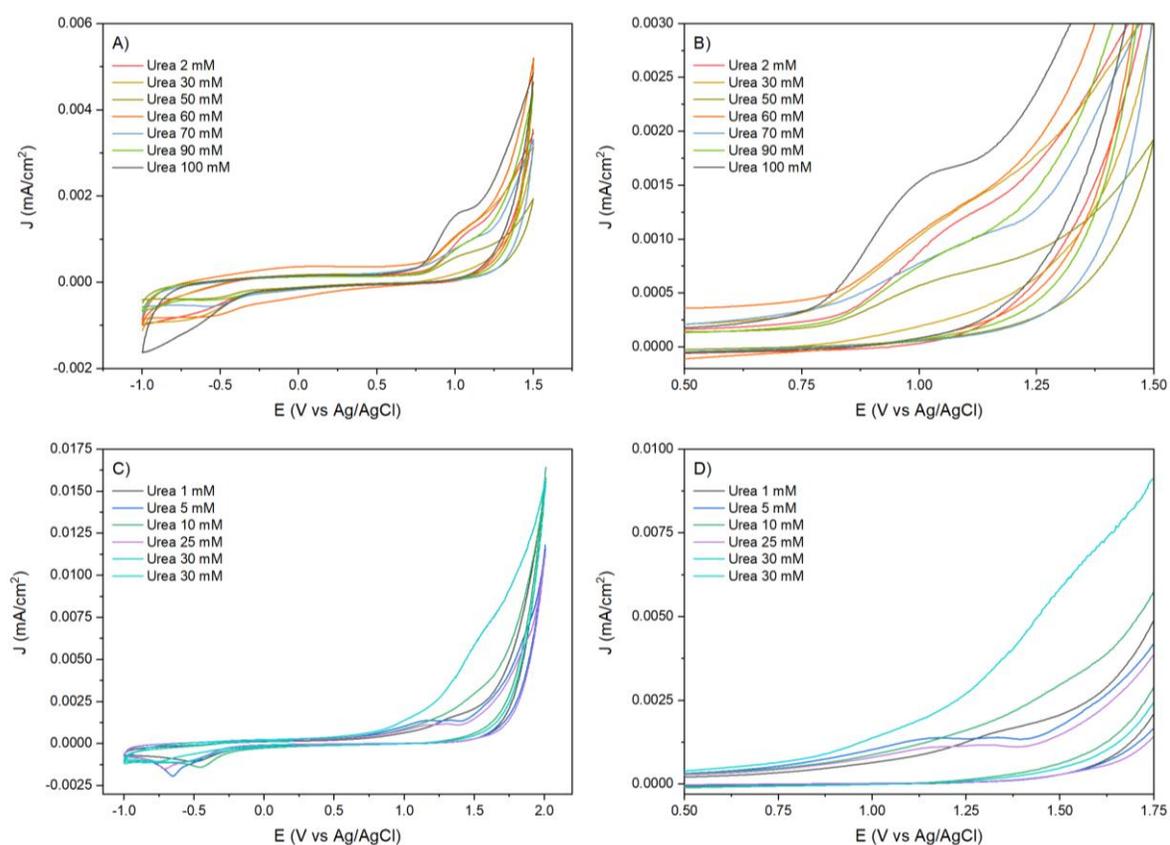


Figura 7.18. Voltametrías cíclicas de electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de MWCNT/IrO₂NP's para soluciones de urea a diferentes concentraciones, de 1 mM a 100 mM.

Adicionalmente, las nanopartículas de NiO (NiO-NP) se han utilizado con éxito para la fabricación de un biosensor de urea. Una fina película de nanopartículas de NiO depositadas sobre un sustrato de vidrio recubierto de óxido de indio y estaño (ITO) sirve como matriz eficaz para la inmovilización de la ureasa (Ur), en dicho experimento se reporta la identificación propiamente de urea en un potencial de alrededor de 0.45 V, en una reacción reversible (Tyagi, M., Tomar, M., & Gupta, V., 2013). Analizando la bibliografía, existe una

variación entre los valores de potencial en los que se puede observar algún parámetro que sea útil para la identificación de urea.

Voltametría de pulso diferencial

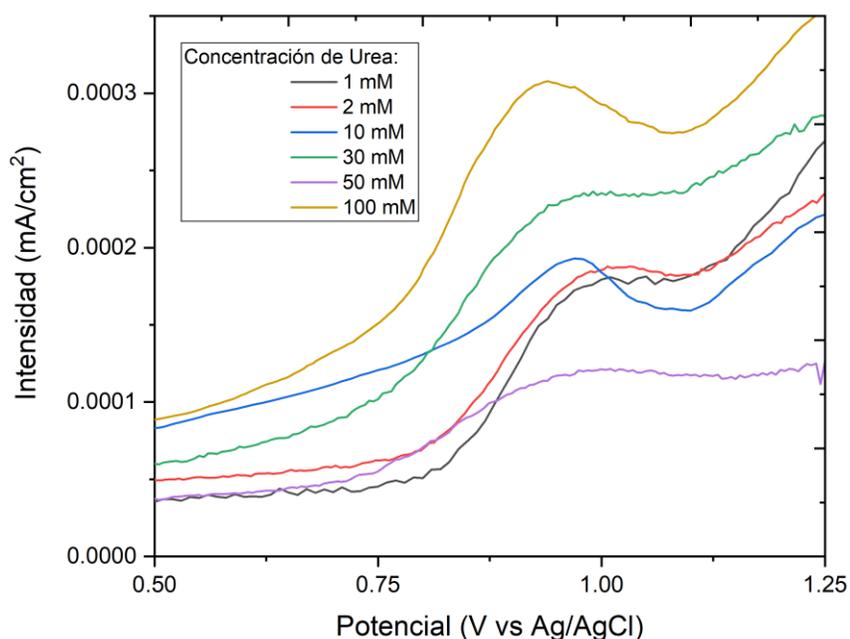


Figura 7.19. Voltametrías de pulso diferencial de electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de MWCNT/IrO₂NP's/ureasa para soluciones de urea a diferentes concentraciones, de 1 mM a 100 mM.

La **Figura 7.19** muestra las voltametrías de pulso diferencial aplicadas en un electrolito de urea a diferentes concentraciones utilizando un electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de MWCNT / IrO₂NP's / ureasa. Se puede observar como existe un crecimiento en la densidad de corriente (j) con respecto a la concentración, sin embargo, también se puede observar un ligero desplazamiento a la izquierda variando de una concentración a otra; aproximadamente se observa la señal en su punto más alto en 0.94 V correspondiente a la concentración de 100 mM, las señales de 1 y 2 mM se encuentran en 1.01 V. También se puede apreciar que no todas las curvas poseen un crecimiento conforme a la concentración, la curva de 50 mM rompe con esta tendencia, lo cual se puede deber a un

error experimental del laboratorista, sin embargo, este tipo de resultados dificultan la reproducibilidad del electrodo.

7.3.2 Sistema CNF / IrO₂NP's

Voltametría Cíclica

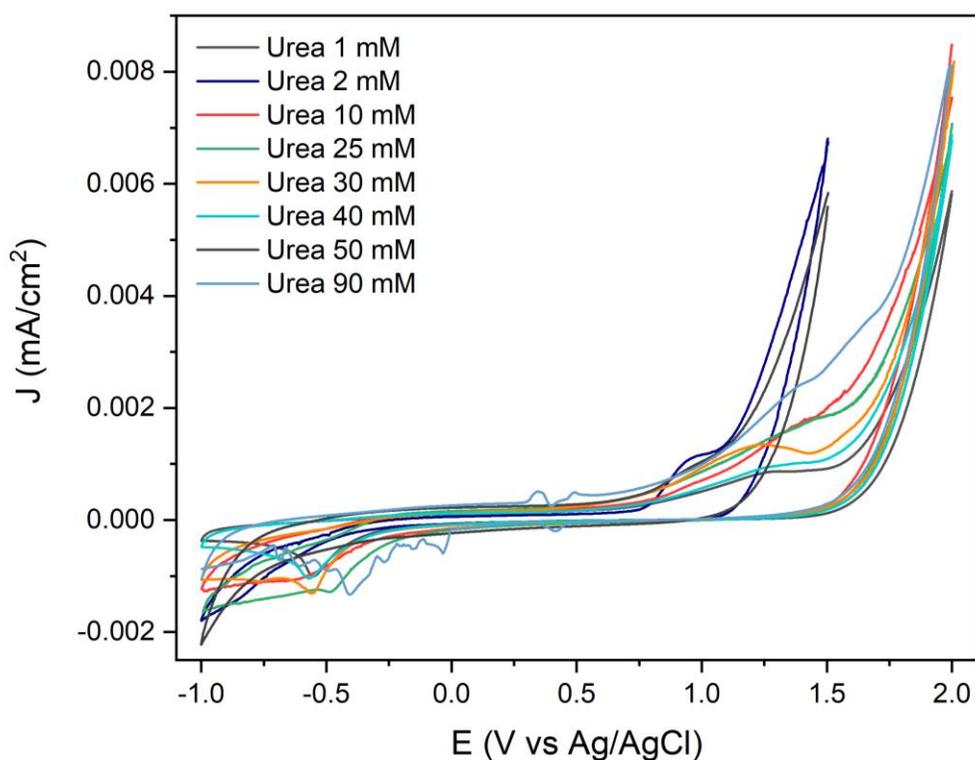


Figura 7.20. Voltametrías cíclicas de electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de CNF/IrO₂NP's para soluciones de urea a diferentes concentraciones, de 1 mM a 90 mM.

De manera similar al sistema basado en nanotubos de carbono, se evaluó el sistema de nanofibras en diferentes ventanas de potencial, para buscar y/o identificar señales en un rango de experimentación más amplio, a pesar de lo anterior, los resultados son muy similares, pues se pudo apreciar la formación de una señal anódica alrededor de 1 a 1.25 V vs Ag/AgCl. Silva, J. C. M., et al. reportan una señal alrededor de -0.43 a -0.48 V vs Hg/HgO para la oxidación de amoníaco utilizando nanopartículas de iridio-rodio soportadas en carbono; cabe

resaltar que las condiciones varían entre los experimentos reportados en dicha literatura y en este trabajo, debido a esto se realiza la conversión para compararlas en función del electrodo normal de hidrógeno (ENH).

- $1 - 1.25 \text{ V vs Ag/AgCl} \approx 1.197 - 1.447 \text{ V vs ENH}$
- $-0.43 - -0.48 \text{ V vs Hg/HgO} \approx 0.496 - 0.446 \text{ vs ENH}$

Como se puede observar, los resultados no son equivalentes, por otra parte, Khan, S., *et al* (2021) reportan que el potencial AmER es de -0.77 V vs ENH . Lo cual nos presenta otra variación en el valor de la oxidación de amoníaco.

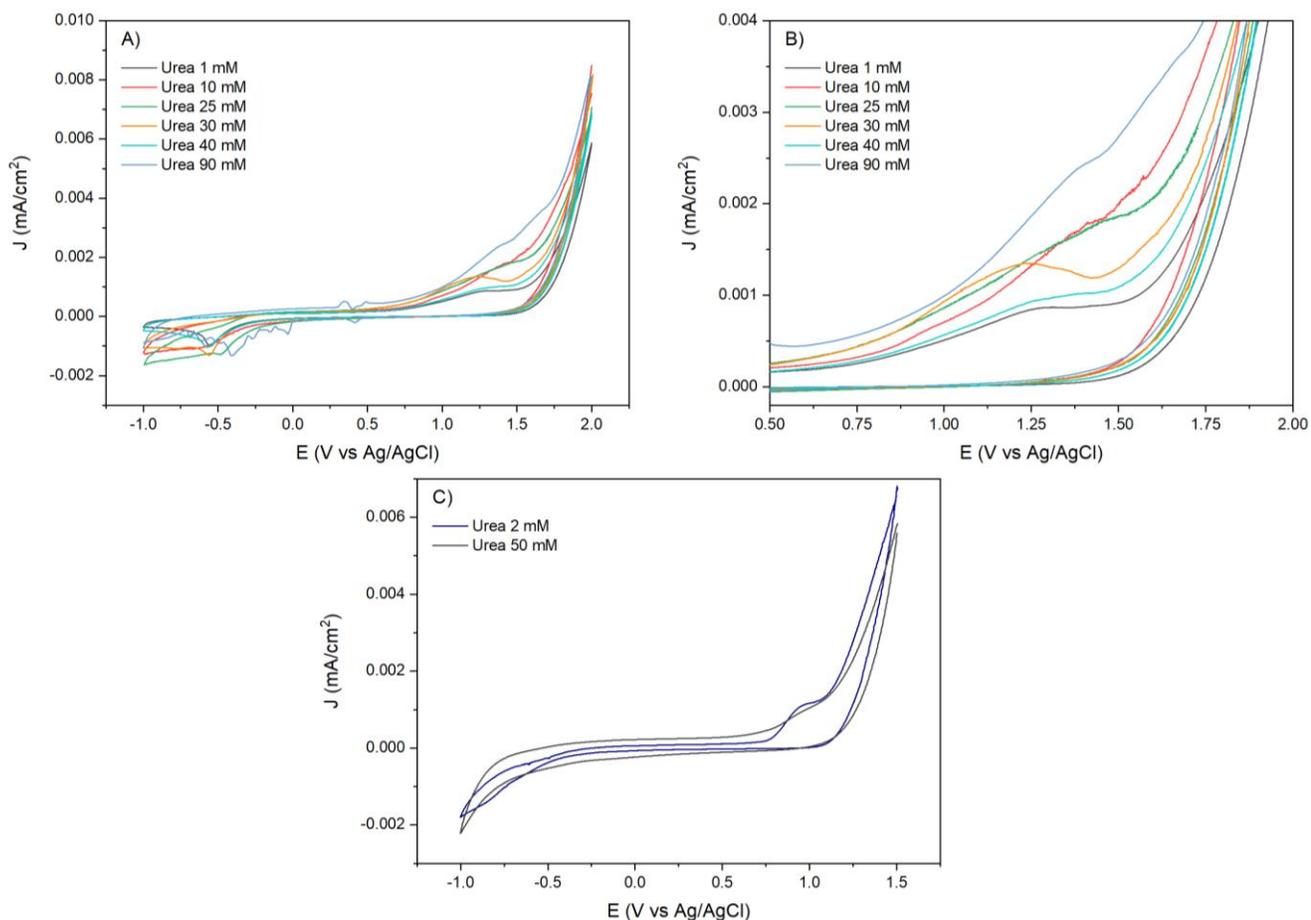


Figura 7.21. Voltametrías cíclicas de electrodo de carbono vítreo modificado con tinta catalítica de CNF/IrO₂NP's para soluciones de urea a diferentes concentraciones, de 1 mM a 90 mM.

En la **Figura 7.21** se pueden observar diferentes voltametrías cíclicas generadas utilizando un electrodo de carbón vítreo cubierto de tinta catalítica de CNF / IrO₂NP's / ureasa, se llevaron a cabo menos pruebas en la ventana de potencial que llega a 1.5 V; se alcanza a observar que el incremento en la densidad de corriente no es lineal conforma aumenta la concentración.

Voltametría de pulso diferencial

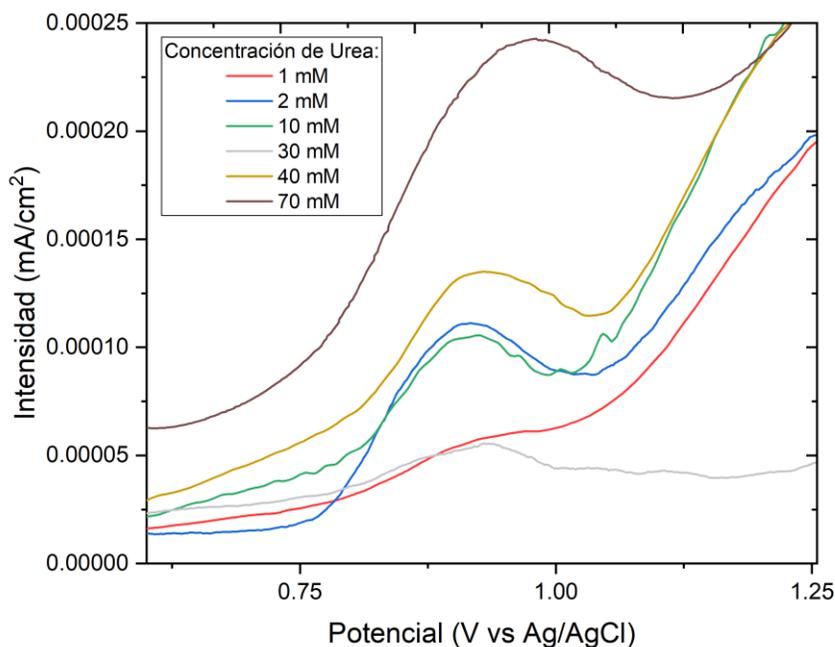


Figura 7.22. Voltametrías de pulso diferencial de electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de CNF/IrO₂NP's para soluciones de urea a diferentes concentraciones, de 1 mM a 70 mM.

Al igual que en las DPV generadas con el sistema de nanotubos, la figura 7.22 muestra las voltametrías de pulso diferencial aplicadas en un electrolito de urea a diferentes concentraciones utilizando un electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de CNF / IrO₂NP's / ureasa. Se puede observar como existe un crecimiento en la densidad de corriente (j) con respecto a la concentración, sin embargo, en este caso el desplazamiento del potencial hacia la izquierda es prácticamente imperceptible, pero existe, para corroborarlo se

puede observar la señal de 70 mM en su punto más alto a un potencial de 0.98 V en un valor de 0.0002427 mA/cm².

Los resultados presentan un crecimiento en la densidad de corriente a partir de 1 V, como si existiera otra señal después de la señal anódica, esto puede ser nuevamente debido a la reacción de evolución de oxígeno, que se presenta alrededor del mismo potencial, pero al usar contraelectrodos diferentes se asume que las especies siguen reaccionando, no obstante, la mayor parte del electrolito de la solución de urea corresponde a una solución buffer, la cual presenta los compuestos suficientes para llevar a cabo la reacción de evolución de oxígeno la cual podría interferir con el análisis y modificar las señales, debido a esto se observa la poca estabilidad en el análisis, finalmente, se atribuye la reacción de evolución debido a la presencia de burbujas en el electrodo.

7.3.3 Sistema Vulcan / IrNP's

Voltametría cíclica

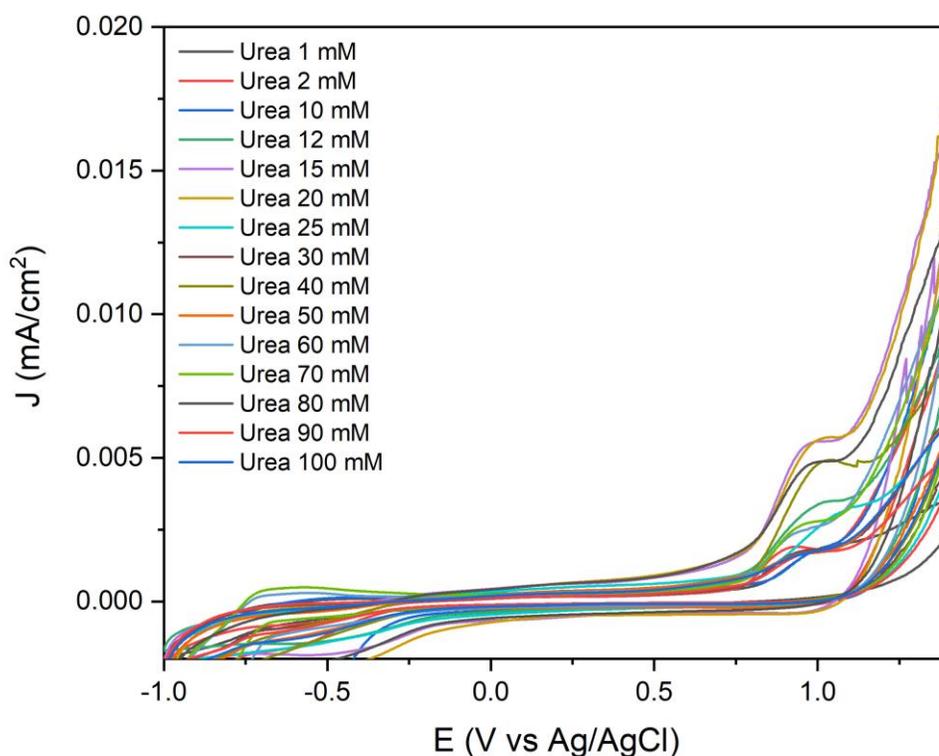


Figura 7.23. Voltametrías cíclicas de electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de Vulcan/IrNP's para soluciones de urea a diferentes concentraciones, de 1 mM a 100 mM.

Existió una mayor posibilidad de encontrar una señal anódica a diferentes concentraciones utilizando el sistema Vulcan / IrNP's / ureasa, lo cual se puede observar en las **figuras 7.23** y **7.24**, en ésta última se pueden apreciar diferentes señales por separado, en las imágenes B) y D) se observa que la variación de potencial entre las señales es mínima, el aumento se vuelve más evidente conforme aumenta la concentración.

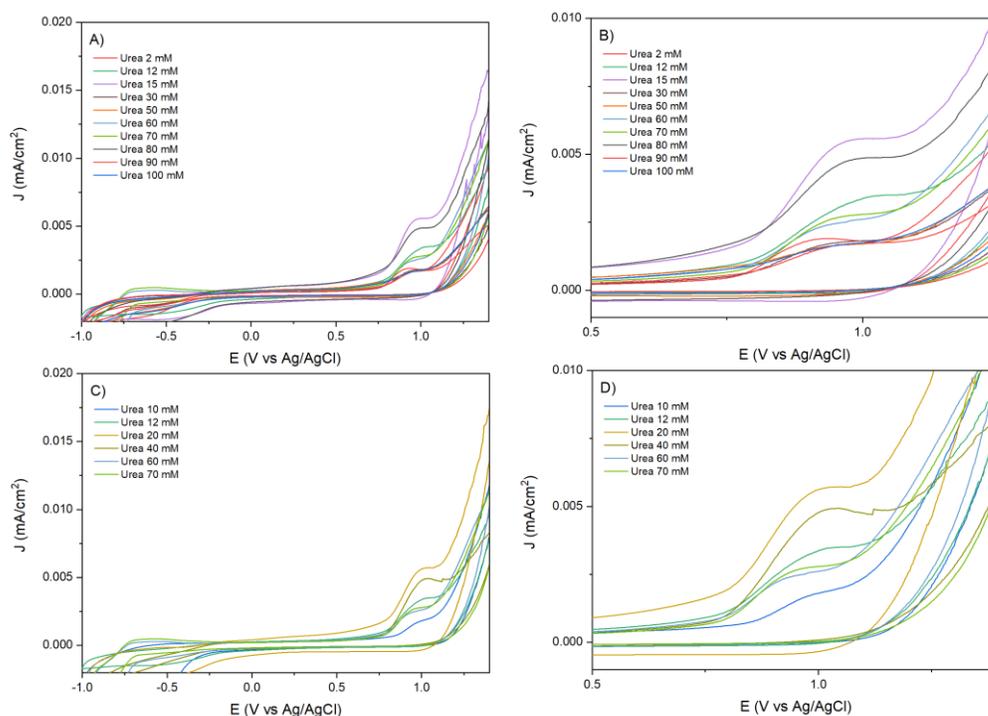


Figura 7.24. Voltametrías cíclicas de electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de Vulcan/IrNP's para soluciones de urea a diferentes concentraciones, de 1 mM a 100 mM.

Voltametría de pulso diferencial

La **Figura 7.25** muestra las voltametrías de pulso diferencial aplicadas en un electrolito de urea a diferentes concentraciones utilizando un electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de Vulcan / IrNP's / ureasa. Nuevamente, se puede observar como existe un crecimiento en la densidad de corriente (j) con respecto a la concentración.

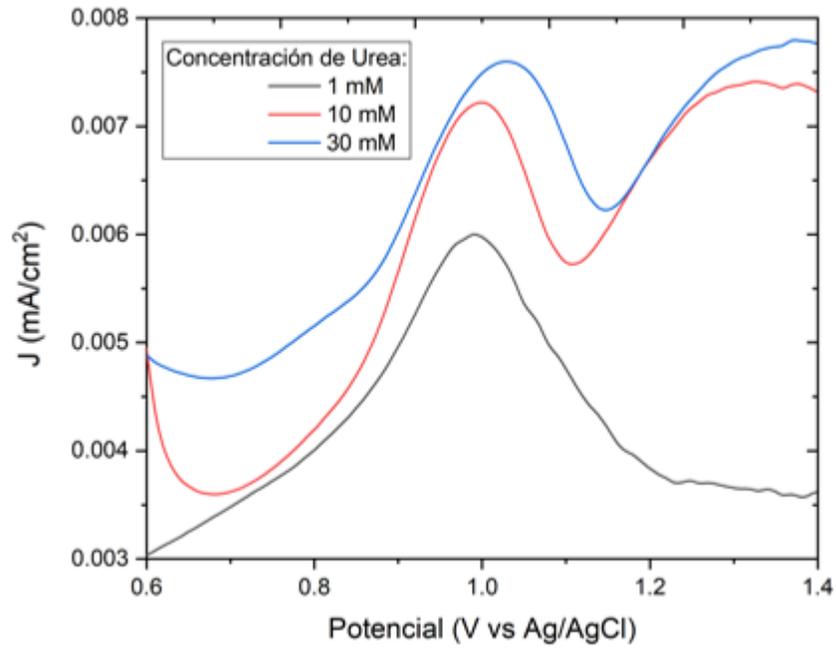


Figura 7.25. Voltametrías de pulso diferencial de electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de Vulcan/IrNP's para soluciones de urea a diferentes concentraciones, de 1 mM a 30 mM.

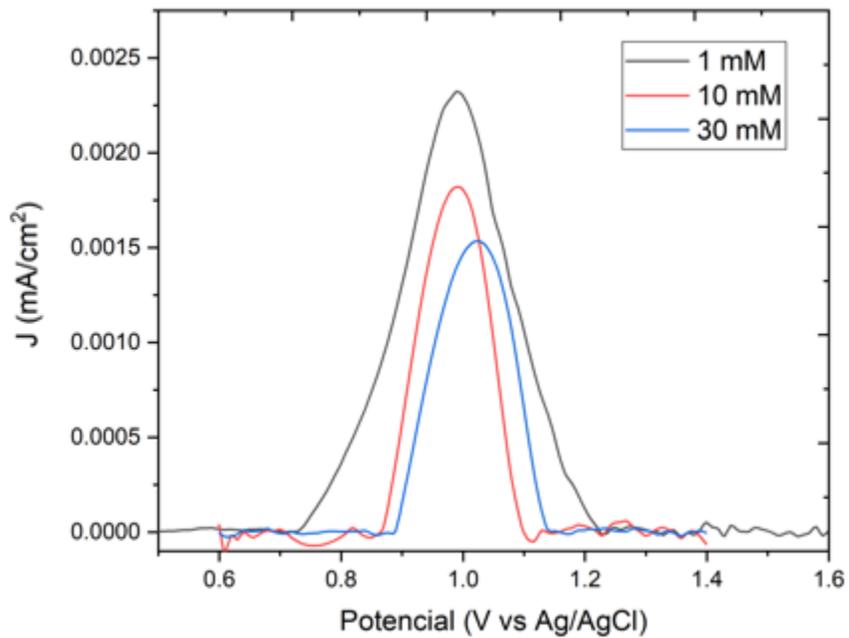


Figura 7.26. Voltametrías de pulso diferencial de electrodo de carbón vítreo modificado, con línea base modificada.

En la **Figura 7.26** se observa la misma figura que la anterior, pero con un ajuste en la línea base con la finalidad de observar de manera precisa el potencial de las señales, pero no la densidad de corriente, pues esta varía al realizar el ajuste. Los resultados son: 0.0075 mA/cm² en un potencial de 1.029 V para una concentración de urea 30 mM, 0.0072 mA/cm² en un potencial de 0.99 V para una concentración de urea 10 mM y 0.0059 mA/cm² en un potencial de 0.98 V para una concentración de urea 1 mM. En este caso el barrido de potencial aumenta ligeramente conforme aumenta la concentración. Aunado a lo anterior, el amoníaco causa una disminución en el pH del electrolito, consecuentemente, una gran cantidad de soluciones homogéneas de urea a diferentes concentraciones fue necesaria para un análisis preciso y duradero.

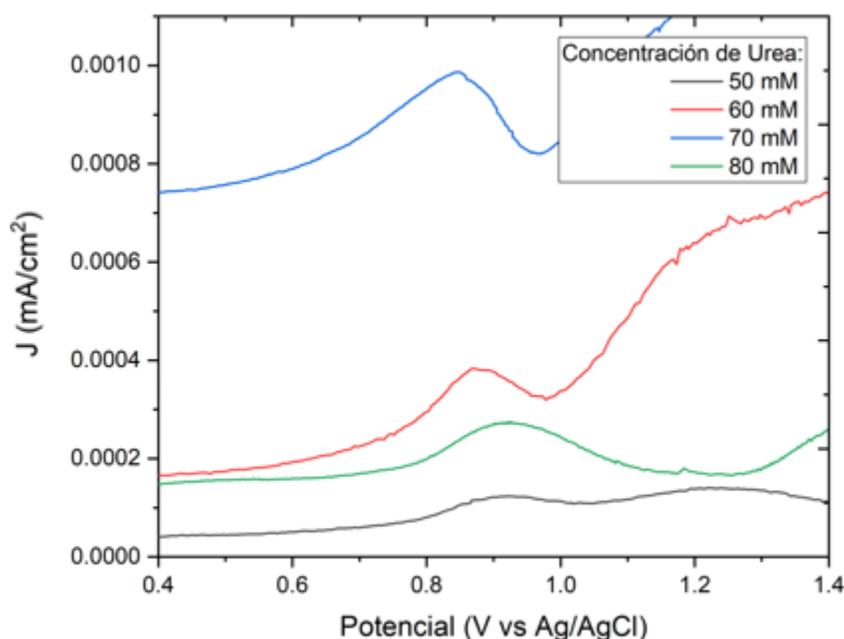


Figura 7.27. Voltametrías de pulso diferencial de electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de Vulcan/IrNP's/ureasa para soluciones de urea a diferentes concentraciones, de 50 mM a 80 mM.

En la **Figura 7.27** se muestran las voltametrías de pulso diferencial aplicadas en un electrolito de urea a diferentes concentraciones utilizando un electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de Vulcan / IrNP's / ureasa en un rango de soluciones de urea con concentraciones entre 50 y 80 mM. Nuevamente, se puede observar como existe un

crecimiento en la densidad de corriente (j) con respecto a la concentración, sin embargo, se observa que el crecimiento no es lineal y las señales no tienen la misma amplitud que en el rango de 1 a 30 mM.

En la **Figura 7.28** se observa la misma figura que la anterior, pero nuevamente con un ajuste en la línea base con la finalidad de observar de manera precisa el potencial de las señales, sin embargo, existen más variaciones en el barrido de potencial que oscilan entre 0.8 y 1.1 V

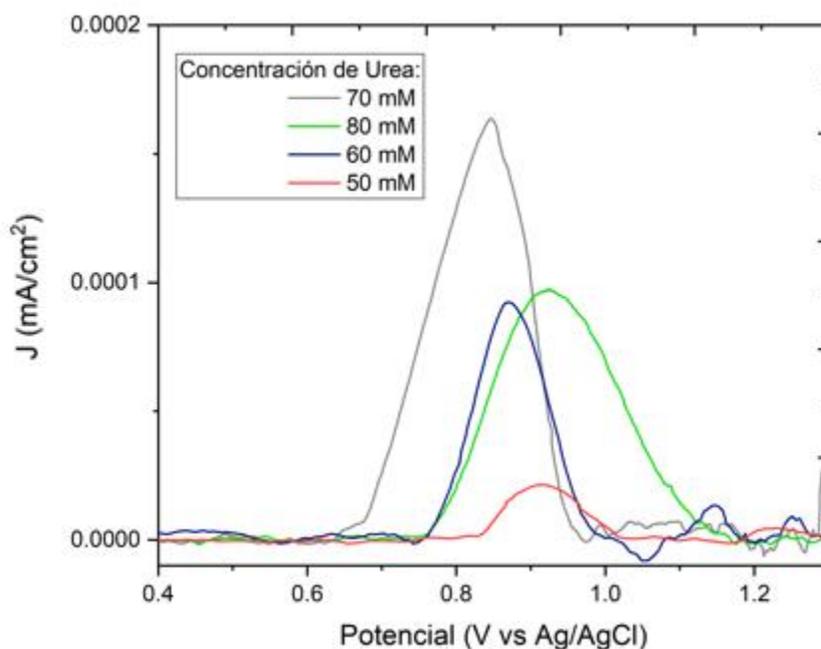


Figura 7.28. Voltametrías de pulso diferencial de electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica Vulcan /IrNP's/ureasa en solución de urea. Diagrama con modificación de línea base.

De acuerdo a las **figuras 7.26 y 7.28** que son en las que se realizó un ajuste de la línea base podemos observar que las intensidades no corresponden a las adecuadas, pero sí nos otorgan una idea dónde se encuentra el punto en el que se realiza la oxidación y a pesar de su intensidad con respecto a la original, nos muestran cual fue la que tuvo un incremento mayor, con respecto al avance del potencial.

7.3.4 Curvas de calibración

Como se puede observar en las voltametrías cíclicas y voltametrías de pulso diferencial la densidad de corriente y el potencial pueden variar linealmente con respecto a la concentración, aumentando o disminuyendo el potencial o la intensidad, lo que correspondería al funcionamiento de un biosensor potenciométrico o amperométrico, respectivamente.

Se optó por trabajar con el sistema Vulcan / IrNP's / ureasa rescatando los mejores resultados obtenidos a partir de las CV y DPV, dichos resultados debieron satisfacer el crecimiento lineal en el potencial o en la densidad de corriente, debido a lo anterior se decidió utilizar algunos de los ciclos generados en CV como se muestra en la siguiente figura.

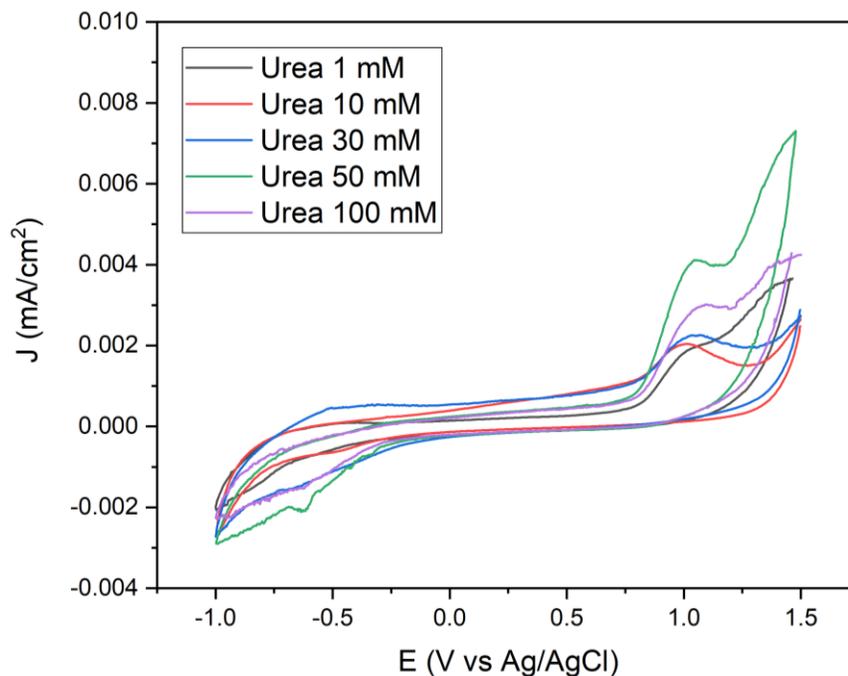


Figura 7.29. Voltametría Cíclica de un electrodo de carbón vítreo decorado con tinta catalítica Vulcan/IrO₂NP's/ureasa en solución de urea a diferentes concentraciones.

Como se puede observar en la **Figura 7.29**, el crecimiento más evidente es en la densidad de corriente, mientras que el potencial varía ligeramente. A una concentración de 50 mM de

urea no existe un crecimiento lineal en a la densidad de corriente debido que presenta un aumento muy significativo, esto puede ser debido a la saturación del electrodo de trabajo, es decir, existen residuos que interfieren o afectan la medición.

Tabla 3. Datos de la corriente y el potencial utilizados para la elaboración de la curva de calibración, obtenidos con respecto a la concentración de urea.

| Concentración (mM) | Corriente (μA) | E (V vs Ag/AgCl) |
|---------------------------|---|-------------------------|
| 1 | 122.7 | 1.010 |
| 10 | 134.8 | 1.013 |
| 30 | 148.1 | 1.048 |
| 50 | 271.3 | 1.059 |
| 100 | 197.9 | 1.084 |

En las Tabla 3 podemos observar los valores extraídos de la voltametría cíclica para ser utilizados en la curva de calibración. El valor de la corriente para una concentración de urea 50 mM rompe la tendencia lineal significativamente, por lo cual se omite en la curva, más no lo hace en el caso del potencial. Es evidente que a pesar de que existe variación en el potencial, esta es mínima en comparación con la variación en la corriente.

De acuerdo a la **Figura 7.30**, las curvas de calibración poseen cierta linealidad, y debido a los valores mostrados en ambas curvas, podemos considerar que la R^2 muestra un comportamiento más lineal evidente en el inciso A, es decir, el crecimiento en la intensidad de corriente puede predecirse de manera más exacta a través de la ecuación de dicho inciso; Es posible generar un biosensor para analizar la variación de la corriente a un potencial constante, lo que significa que el biosensor sería amperométrico. Aunado a lo anterior, como se puede observar en el eje x de las curvas de calibración el intervalo de aumento en la corriente es mayor con respecto al cambio en el potencial al cual se lleva a cabo el análisis, concluyendo que el cambio del voltaje es mínimo y se mantiene prácticamente constante.

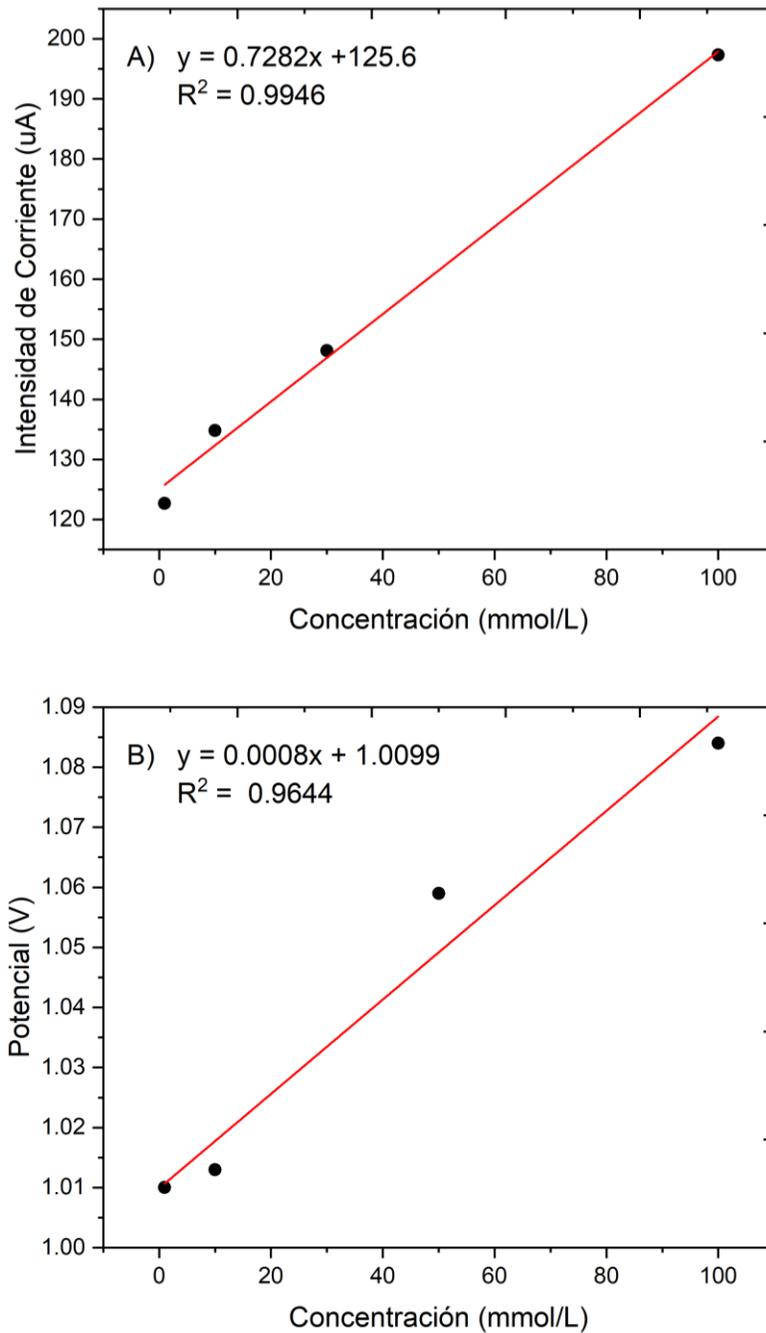


Figura 7.30. Curvas de calibración creadas a partir del análisis del sistema Vulcan / IrNP's / ureasa con respecto a la: A) Corriente y el B) Potencial.

A partir de la curva de calibración A, se calculó el límite de detección (LOD) del biosensor a través de la siguiente ecuación:

$$\frac{3 * \sigma_{control}}{b} \quad (7.1)$$

Donde σ es la desviación estándar de los datos de la muestra y b es la pendiente de la curva. A través de la ecuación 7.1, se encontró que el límite de detección del biosensor con el electrodo Vulcan / IrNP's / ureasa es de 0.433 mM \approx 2.6006 mg/dL, que comparado con el método colorimétrico enzimático de Berthelot, descrito anteriormente, posee menor sensibilidad a pesar de su capacidad de detectar pequeñas cantidades de urea.

7.4 Pruebas en Celda de Combustible

7.4.1 Cronoamperometría

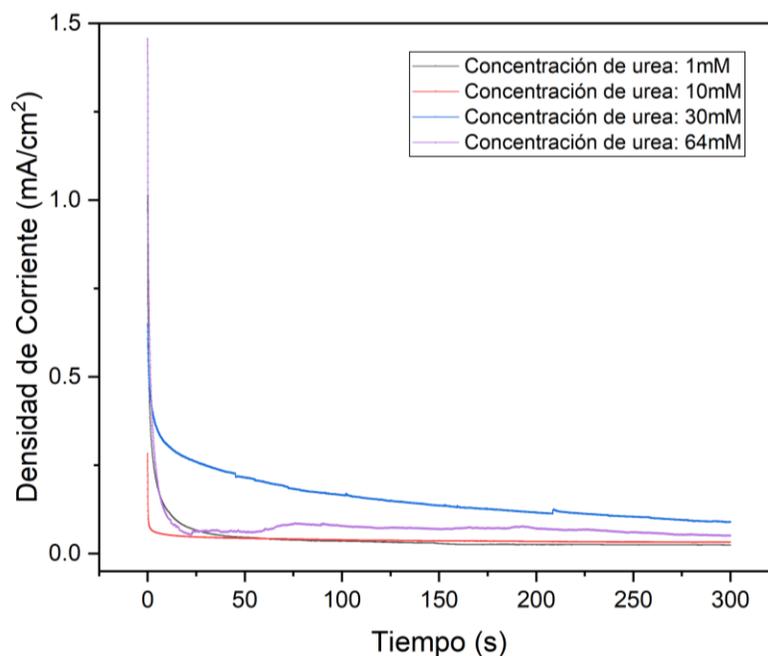


Figura 7.31. Cronoamperometría a 1 V en celda de combustible microfluídica para un electrodo Vulcan/IrNP's/ureasa en solución de urea: 1 mM, 10 mM, 30 mM y 64 mM.

La **Figura 7.31** muestra las curvas cronoamperométricas en celda completa para el sistema Vulcan/IrO₂NP's/ureasa en diferentes concentraciones de urea que varían de 1 mM hasta 64 mM. La densidad de corriente disminuye continuamente durante los primeros

segundos, pero se estabiliza rápidamente. Dicho decaimiento de corriente se asocia a la consumición de la urea y la ureasa, así como sus respectivos productos, principalmente la oxidación del amoníaco. La acción es sumamente rápida debido a la especificidad del sistema propuesto, pues la enzima ureasa es selectiva y la reacción de hidrólisis forma rápidamente el producto que se oxida, manteniendo estabilidad en el sistema después de 25 segundos iniciado el análisis.

A una concentración 64 mM el sistema no logra estabilizarse, la cantidad de analito puede indicar que está saturado; al mismo tiempo que el amoníaco comienza a oxidarse, la urea y la ureasa presentes en el sistema siguen reaccionando generando más producto, o bien, existe una difusión menos efectiva en la celda de combustible debido a la cantidad de analito, cuya distribución puede ocasionar cambios en la densidad de corriente debido a como seguirán reaccionando los agentes involucrados. Se encontró que a una concentración 30 mM de urea la caída de densidad de corriente es menor, debido a que empieza a decrecer a una densidad de 0.32 mA/cm^2 estabilizándose a una corriente mayor que en las demás concentraciones.

7.4.2 Curvas de Descarga

El potencial de circuito abierto de la celda de combustible microfluídica y las curvas de densidad de potencia se aprecian en las **figuras 7.32 y 7.33**. En la primera se nos muestra la curva generada en celda completa con el electrodo Vulcan/IrNP's como ánodo, un contraelectrodo de platino como cátodo y utilizando buffer de fosfatos pH 7 como combustible.

En la **Figura 7.33** se nos muestra la curva generada en celda completa con el electrodo Vulcan/IrNP's/ureasa como ánodo, un contraelectrodo de platino como cátodo y solución de urea a diferentes concentraciones como combustible.

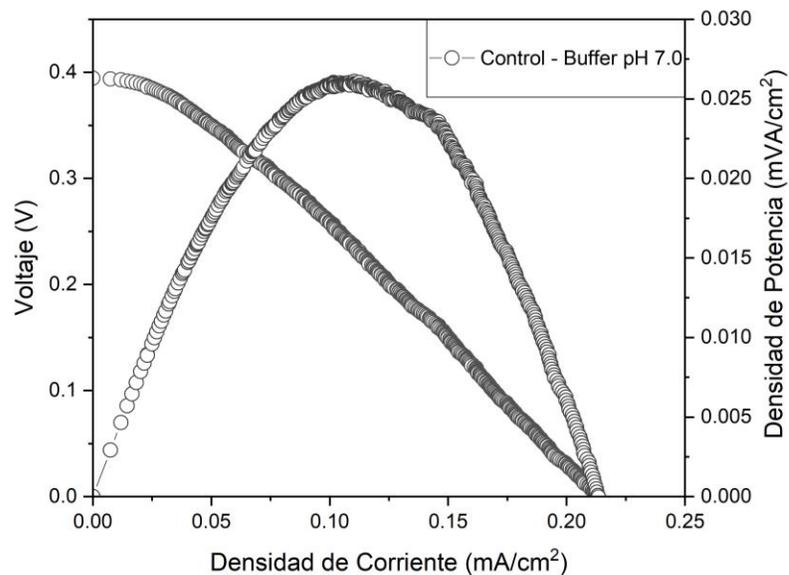


Figura 7.32. Polarización y curva de descarga para celda de combustible microfluídica (de papel) de un electrodo de papel toray con tinta catalítica Vulcan/IrNP's como ánodo en solución de buffer de fosfatos pH 7.0 como combustible.

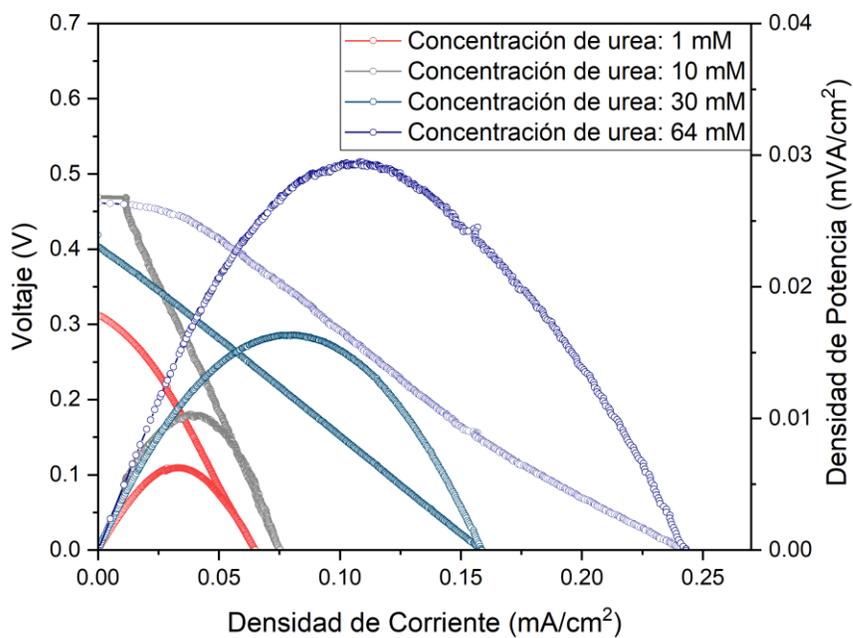


Figura 7.33. Polarización y curva de descarga para celda de combustible microfluídica de un electrodo de papel toray con tinta catalítica Vulcan/IrNP's/ureasa como ánodo utilizando diferentes concentraciones de urea como electrolito en un rango de 1 mM a 64 mM a 20 mV/s.

Se puede apreciar a través de las curvas de descarga que no existen caídas de potencial a bajas densidades de corriente, por lo cual no hay pérdidas por polarización de activación a concentraciones de 1 mM y 64 mM, en las concentraciones 10 mM y 30 mM existe oposición al flujo de la corriente eléctrica ya sea por problemas en la difusión o residuos en la celda de combustible, son curvas resistivas, no obstante, es de mayor importancia analizar la densidad de potencia, la cual se compone del potencial como de la densidad de corriente, en la cual se ve un aumento conforme a la concentración. De manera general, se puede confirmar la especificidad de la reacción de hidrólisis entre la urea y la ureasa que es prácticamente instantánea, formando así amoníaco que es oxidado. Esto se evidencia debido a la caída de potencial por pérdidas óhmicas debido a la oxidación del subproducto (amoníaco) de la reacción inicial, que es más apreciable a una concentración de 64 mM.

El potencial para la concentración 1 mM es menor en la **Figura 7.33** comparándola con la **Figura 7.32** donde no hay concentración de urea. Para ser de utilidad analítica debería existir una relación con la concentración del analito que se cuantifica, en este caso urea, siendo así, el error analítico radica en la difusión de la solución de urea en la celda de combustible microfluídica por contaminación con agentes externos o falta de material en el ánodo. De acuerdo a los resultados, para que exista un cambio de difusión a electroconversión es necesario que se trabaje a concentraciones mayores a 1 mM.

Es de gran interés analizar el potencial generado en las curvas, debido a que se trata de un potencial de circuito abierto, es decir, no se requiere de ningún estímulo para generarlo, y corresponde a la parte preliminar en la elaboración de un biosensor autoalimentable. Como se observa en la **Figura 7.33**, el potencial de circuito abierto aumenta conforme aumenta la concentración de urea en el analito.

8. Conclusiones

Este trabajo se realizó con el propósito de evaluar el potencial de las nanoestructuras de carbono en el uso de biosensores. La formulación del electrodo como un bioánodo capaz de llevar a cabo la identificación de la urea a través de un enlace electroquímico es presentada, se observa que la identificación de analito se lleva a cabo con una intensidad de corriente máxima de $271.3 \mu\text{A}$ para una solución de urea con concentración de 50 mM , más no pudo ser alcanzada por concentraciones mayores, pero proporcionan una idea del posible uso del electrodo en celdas de combustible para generación de energía, así como la creación de un biosensor autoalimentable.

El potencial uso de la formulación propuesta en un biosensor es alta, sin embargo, existen parámetros que deben controlarse con el máximo cuidado posible, como la temperatura de la enzima y el trabajo con un depósito adecuado de tinta catalítica, debido a que a pesar de ser una cantidad muy pequeña ($2 \mu\text{L}$) la variación en la corriente de un análisis a otro puede ser muy elevada, lo cual afecta la reproducibilidad, que es necesaria para el estudio del proyecto en un laboratorio diferente, es decir, poder obtener los mismos resultados sin importar el lugar de trabajo mientras se respete la formulación. Las plataformas de carbono nanoestructuradas demuestran ser una buena alternativa para la creación de transductores en un biosensor por sus buenas propiedades eléctricas y mecánicas.

Se presentan mejoras con respecto a los test o evaluaciones que se ejecutan actualmente para detección de urea, pues el límite de detección de 0.433 mM nos otorga un valor con el cuál es posible trabajar a bajas concentraciones, lo cual permite encontrar las cantidades más pequeñas de urea en un sistema o inclusive trazas; a pesar de lo anterior no mejora el límite de detección reportado en el método de Berthelot. Debido a esto se concluye que aún es necesaria la ejecución de pruebas en fluidos simulados para progresar con el proyecto, dichos fluidos pueden corresponder a análisis en humanos o en leche vacuna.

Perspectivas y trabajo a futuro:

Durante la realización de esta tesis nos enfocamos en la síntesis de las nanopartículas soportadas en las diferentes estructuras de carbono, así como de su análisis como un sistema con viabilidad en el uso de biosensores de urea. El electrodo formulado demuestra ser inestable, se propone intentar una funcionalización diferente y la oxidación de forma no enzimática para realizar un biosensor que, aunque sea menos selectivo, posea mayor estabilidad. sin embargo, se requiere de generar una formulación para que el electrodo sea compatible con fluidos y verificar su efectividad en leche de vaca considerando las pruebas de interferentes que pueden existir.

10. Referencias bibliográficas

- Alatawi, F. S., Monier, M., & Elsayed, N. H. (2018). Amino functionalization of carboxymethyl cellulose for efficient immobilization of urease. *International Journal of Biological Macromolecules*, *114*, 1018–1025. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.142>
- Altinkaya, S. A. (2015). Encyclopedia of Membranes. *Encyclopedia of Membranes*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-40872-4>
- Alquisira, J. P. Elementos Químicos. El silicio (Si) y la Industria Electrónica.
- Andrade Guel, M. L., López López, L. I., & Sáenz Galindo, A. (2012). Nanotubos de carbono: funcionalización y aplicaciones biológicas. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, *43*(3), 9-18.
- Arora, B., Tandon, R., Attri, P., & Bhatia, R. (2017). Chemical crosslinking: Role in protein and peptide science. *Current Protein and Peptide Science*, *18*(9), 946-955. NCBI
- Atchudan, R., Pandurangan, A., & Joo, J. (2015). Effects of nanofillers on the thermo-mechanical properties and chemical resistivity of epoxy nanocomposites. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, *15*(6), 4255-4267.
- Baingane, A., Mburu, N., & Slaughter, G. (2017). Sensors & Transducers Simultaneous Monitoring of Glucose and Lactate by Self-powered Biosensor. *Sensors & Transducers*, *214*(7), 34–38. <http://www.sensorsportal.com>
- Balasubramanian A., Ponnuraj K., (2010) *Crustal structure of the first plant urease from jack bean: 83 years of journey from its first crystal to molecular strucutre*, *J. Mol. Biol*, *400*, 274-83.
- Benini, S., Rypniewski, W. R., Wilson, K. S., Miletti, S., Ciurli, S., & Mangani, S. (1999). A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels. *Structure*, *7*(2), 205–216. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80026-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80026-4)
- Blakemore, J. D., Crabtree, R. H., & Brudvig, G. W. (2015). Molecular catalysts for water

- oxidation. *Chemical Reviews*, 115(23), 12974-13005.
- Botewad, S. N., Gaikwad, D. K., Girhe, N. B., Thorat, H. N., & Pawar, P. P. (2021). Urea biosensors: A comprehensive review. *Biotechnology and Applied Biochemistry*.
- Brady, S., Siegel, G., Albers, R. W., & Price, D. L. (Eds.). (2005). *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. Elsevier.
- Brena, B. M., & Batista-Viera, F. (2006). *Immobilization of Enzymes BT - Immobilization of Enzymes and Cells* (J. M. Guisan (Ed.); pp. 15–30). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-053-9_2
- Cardenas-Benitez, B., Djordjevic, I., Hosseini, S., MJ, M., & SO, M.-C. (2018). Review-Covalent Functionalization of Carbon Nanomaterials for Biosensor Applications: An Update. *Journal of the Electrochemical Society*, 165(3), B103–B117. <https://doi.org/10.1149/2.0381803jes>
- Cardenas-Benitez, B., Eschenbaum, C., Mager, D., Korvink, J. G., Madou, M. J., Lemmer, U., Leon, I. De, & Martinez-Chapa, S. O. (2019). Pyrolysis-induced shrinking of three-dimensional structures fabricated by two-photon polymerization: experiment and theoretical model. *Microsystems and Nanoengineering*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41378-019-0079-9>
- Cárdenas, D. (2006). Estado del arte de los sistemas microelectromecánicos Microelectromechanical systems state of the art. *Revisión Revista Ciencia e Ingeniería*, 27(3), 109–117.
- Carlsson, H., & Nordlander, E. (2010). Computational Modeling of the Mechanism of Urease. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2010, 364891. <https://doi.org/10.1155/2010/364891>
- Castillo-Martínez, L., Dector, A., Olivares-Ramírez, J., Amaya Cruz, D., Vera-Morales, J., Ávila-Juárez, L., Marroquín, A., Oaxaca-Jiménez, H. & Santana-Bucio, I. (2020). Evaluación del flujo de una celda de combustible microfluídica. *Nthe*, 9-15.
- Chellapandian, M., & Krishnan, M. R. V. (1998). Chitosan-poly (glycidyl methacrylate) copolymer for immobilization of urease. *Process Biochemistry*, 33(6), 595–600. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)80001-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)80001-0)
- Cheng, Y., Yang, F., Gong, J., Wu, B., Zhang, Z., & Chu, J. (2021). Platinum Nanoparticles Decorated IrO₂@ MWCNT as an Improved Catalyst for Oxygen Evolution Reaction.

- ChemistrySelect, 6(29), 7542-7550.
- Conzuelo, F., Ruff, A., & Schuhmann, W. (2018). Self-powered bioelectrochemical devices. *Current Opinion in Electrochemistry*, 12, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2018.05.010>
- Cox, G. M., Mukherjee, J., Cole, G. T., Casadevall, A., & Perfect, J. R. (2000). Urease as a Virulence Factor in Experimental Cryptococcosis. *Infection and Immunity*, 68(2), 443 LP – 448. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.2.443-448.2000>
- Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2012). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1–9. doi:10.1007/s13205-012-0071-7
- del Río, D. S. (2011). Estructura y propiedades de las nanofibras de carbono. Aplicación como soporte de electrocatalizadores (Doctoral dissertation, Universidad de Zaragoza).
- Fopase, R., Nayak, S., Mohanta, M., Kale, P., & Balasubramanian, P. (2019). Inhibition assays of urease for detecting trivalent chromium in drinking water. In *Green buildings and sustainable engineering* (pp. 313-323). Springer, Singapore.
- Gonzalez-Solino, C., & Lorenzo, M. D. (2018). Enzymatic fuel cells: Towards self-powered implantable and wearable diagnostics. *Biosensors*, 8(1), 11.
- González Velázquez, V. J. (2015). Nanomateriales de Carbono, síntesis, funcionalización y aplicaciones.
- Grattieri, M., & Minter, S. D. (2018). Self-Powered Biosensors. *ACS Sensors*, 3(1), 44–53. <https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00818>
- Hosseini, S., Ibrahim, F., Rothan, H. A., Yusof, R., Marel, C. van der, Djordjevic, I., & Koole, L. H. (2015). Aging effect and antibody immobilization on COOH exposed surfaces designed for dengue virus detection. *Biochemical Engineering Journal*, 99, 183–192. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.04.001>
- Hsieh, Y.-Y., Zhang, L., DeArmond, D., Kanakaraj, S. N., Adusei, P. K., Alvarez, N. T., Fang, Y., Daum, J., & Shanov, V. (2018). Integrated graphene-sulfur cathode and separator with plasma enhancement for Li-S batteries. *Carbon*, 139, 1093–1103. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbon.2018.08.025>
- Huang, J., Liu, Y., & You, T. (2010). Carbon nanofiber based electrochemical biosensors: A review. *Analytical Methods*, 2(3), 202-211.

- Hubalek, J., Hradecky, J., Adam, V., Krystofova, O., Huska, D., Masarik, M., Trnkova, L., Horna, A., Klosova, K., Adamek, M., Zehnalek, J., & Kizek, R. (2007). Spectrometric and Voltammetric Analysis of Urease – Nickel Nanoelectrode as an Electrochemical Sensor. In *Sensors* (Vol. 7, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/s7071238>
- Jang, H., & Lee, J. (2020). Iridium oxide fabrication and application: A review. *Journal of Energy Chemistry*, 46, 152-172.
- Khan, S., Shah, S. S., Anjum, M. A. R., Khan, M. R., & Janjua, N. K. (2021). Electro-oxidation of ammonia over copper oxide impregnated γ -Al₂O₃ nanocatalysts. *Coatings*, 11(3), 313.
- Kharisov, B. I., & Eldin, M. S. M. (2018). Enzyme Immobilization: Nanopolymers for Enzyme Immobilization Applications. *CRC Concise Encyclopedia of Nanotechnology*, 220–228. <https://doi.org/10.1201/b19457-22>
- Kjeang, E., Djilali, N., & Sinton, D. (2009). Microfluidic fuel cells: A review. *Journal of Power Sources*, 186(2), 353–369. doi:10.1016/j.jpowsour.2008.10.01
- Labtest Diagnóstica S.A. (Octubre, 2013). Urea CE Instrucciones de Uso. https://labtest.com.br/wpcontent/uploads/2016/09/Ref_27_RevOutubro2013_Ref050214_Esp.pdf
- Leistenschneider, D., Zürbes, K., Schneidermann, C., Grätz, S., Oswald, S., Wegner, K., Klemmed, B., Giebeler, L., Eychmüller, A., & Borchardt, L. (2018). Mechanochemical Functionalization of Carbon Black at Room Temperature. In *C — Journal of Carbon Research* (Vol. 4, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/c4010014>
- Martínez-Castelao, A., Górriz, J. L., Bover, J., Segura-de la Morena, J., Cebollada, J., Escalada, J., Esmatjes, E., Fácila, L., Gamarra, J., Gràcia, S., Hernández-Moreno, J., Llisterri-Caro, J. L., Mazón, P., Montañés, R., Morales-Olivas, F., Muñoz-Torres, M., de Pablos-Velasco, P., de Santiago, A., Sánchez-Celaya, M., ... Tranche, S. (2014). Documento de consenso para la detección y manejo de la enfermedad renal crónica. *Endocrinología y Nutrición*, 61(9), e25–e43. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.endonu.2014.06.003>
- Mathur, R. B., Chatterjee, S., & Singh, B. P. (2008). Growth of carbon nanotubes on carbon fibre substrates to produce hybrid/phenolic composites with improved mechanical properties. *Composites Science and Technology*, 68(7-8), 1608-1615.

- Mazzei, L., Cianci, M., Contaldo, U., Musiani, F., & Ciurli, S. (2017). Urease Inhibition in the Presence of N-(n-Butyl)thiophosphoric Triamide, a Suicide Substrate: Structure and Kinetics. *Biochemistry*, 56(40), 5391–5404. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00750>
- Mazzei, L., Musiani, F., & Ciurli, S. (2020). The structure-based reaction mechanism of urease, a nickel dependent enzyme: tale of a long debate. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 25(6), 829-845.
- McNeil, S. E. (2005). Nanotechnology for the biologist. *Journal of leukocyte biology*, 78(3), 585-594.
- Mehrotra, P. (2016). Biosensors and their applications – A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6(2), 153–159. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>
- Meléndez-Ortiz, H. I., Peralta, R. D., Bucio, E., & Zerrweck-Maldonado, L. (2014). Preparation of stimuli-responsive nanogels of poly [2-(dimethylamino) ethyl methacrylate] by heterophase and microemulsion polymerization using gamma radiation. *Polymer Engineering & Science*, 54(7), 1625-1631.
- Mobley, H. L., & Hausinger, R. P. (1989). Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 53(1), 85-108.
- Nava-Jiménez, R., & Escamilla-Santana, C. (2016). Estimación de la demanda, aplicada a una innovación de tipo MEMS mediante el modelo de Bass. *Revista CEA*, 2(3), 49. <https://doi.org/10.22430/24223182.265>
- Nelson D. y Cox, M. Lehninger. Principios de Bioquímica. 6ª edición. Ediciones Omega, Barcelona, 2015.
- Palchetti, I., & Mascini, M. (2010). Biosensor technology: a brief history. In *Sensors and Microsystems* (pp. 15-23). Springer, Dordrecht.
- Pilloni, O., Madou, M., Mendoza, D., Muhl, S., & Oropeza-Ramos, L. (2019). Methodology and fabrication of adherent and crack-free SU-8 photoresist-derived carbon MEMS on fused silica transparent substrates. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 29(2), 27002. <https://doi.org/10.1088/1361-6439/aaf70f>
- Putzbach, W., & Ronkainen, J. N. (2013). Immobilization Techniques in the Fabrication of

- Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review. In *Sensors* (Vol. 13, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/s130404811>
- Rodríguez, L. M. T., & Montes-Rojas, A. Conversión de potenciales entre distintos electrodos de referencia: Una analogía para facilitar su comprensión.
- Rodríguez, S. B., Alonso-Gaite, A., & Álvarez-Benedí, J. (2005). Characterization of Nitrogen Transformations, Sorption and Volatilization Processes In Urea Fertilized Soils. *Vadose Zone Journal*, 4(2), 329–336. <https://doi.org/10.2136/vzj2004.0102>
- Silva, J. C. M., Assumpção, M. H., Hammer, P., Neto, A. O., Spinace, E. V., & Baranova, E. A. (2017). Iridium–rhodium nanoparticles for ammonia oxidation: electrochemical and fuel cell studies. *ChemElectroChem*, 4(5), 1101-1107.
- Simon, J., Flahaut, E., & Golzio, M. (2019). Overview of carbon nanotubes for biomedical applications. *Materials*, 12(4), 624.
- Singh, M., Verma, N., Garg, A. K., & Redhu, N. (2008). Urea biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 134(1), 345–351. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2008.04.025>
- Slaughter, G. (2006). Current advances in biosensor design and fabrication. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*, 1-25.
- Sokolov, A. N., Roberts, M. E., & Bao, Z. (2009). Fabrication of low-cost electronic biosensors. *Materials today*, 12(9), 12-20.
- Soozanipour, A., & Taheri-Kafrani, A. (2018). Chapter Fourteen - Enzyme Immobilization on Functionalized Graphene Oxide Nanosheets: Efficient and Robust Biocatalysts. In C. V. B. T.-M. in E. Kumar (Ed.), *Enzyme Nanoarchitectures: Enzymes Armored with Graphene* (Vol. 609, pp. 371–403). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.06.010>
- Tamaddon, F., Ghazi, S., & Noorbala, M. R. (2016). Urease-catalyzed synthesis of aminocyanopyridines from urea under fully green conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 127, 89–92. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.02.015>
- Testerman, T. L., McGee, D. J., & Mobley, H. L. T. (2001). Helicobacter pylori growth and urease detection in the chemically defined medium Ham's F-12 nutrient mixture. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(11), 3842–3850.

<https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.3842-3850.2001>

- Tyagi, M., Tomar, M., & Gupta, V. (2013). NiO nanoparticle-based urea biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 41, 110-115.
- Vite González, D. (2020). Desarrollo de sistema enzimático tipo cascada para aplicación en celdas de combustible microfluídicas (Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Querétaro).
- Wang, H., Ran, J., & Jiang, T. (2014). Urea. *Urea Transporters*, 7-29.
- Wang, J. (2005). Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 17(1), 7-14.
- Wang, Z., Zang, C., Cui, K., Schones, D. E., Barski, A., Peng, W., & Zhao, K. (2009). Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell*, 138(5), 1019-1031.
- Witte, C.-P. (2011). Urea metabolism in plants. *Plant Science*, 180(3), 431–438. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.11.010>
- Xia, J. L., Dai, C., Michalopoulos, G. K., & Liu, Y. (2006). Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation. *The American journal of pathology*, 168(5), 1500-1512.
- Yang, B., & Sands, J. M. (Eds.). (2014). *Urea transporters* (Vol. 73). Springer.
- Yudkoff, M. Urea Cycle (2005). Urea cycle; National Center for Biotechnology Information - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27982/>
- Yokoyama, M., The Urea Cycle Step by Step, *News Medical Life Sciences* (April, 2021) <https://www.news-medical.net/health/The-Urea-Cycle-Step-by-Step.aspx>
- Zhang, J., Zhang, F., Yang, H., Huang, X., Liu, H., Zhang, J., & Guo, S. (2010). Graphene Oxide as a Matrix for Enzyme Immobilization. *Langmuir*, 26(9), 6083–6085. <https://doi.org/10.1021/la904014z>
- Zhang, Y., Zhou, Z., Fan, Z., Zhang, S., Zheng, F., Liu, K., Zhang, Y., Shi, Z., Chen, L., Li, X., Mao, Y., Wang, F., Sun, Y.-L., & Tao, T. H. (2018). Self-Powered Multifunctional Transient Bioelectronics. *Small*, 14(35), 1802050. <https://doi.org/10.1002/sml.201802050>
- Zhang, S., Wright, G., & Yang, Y. (2000). Materials and techniques for electrochemical

- biosensor design and construction. *Biosensors and Bioelectronics*, 15(5-6), 273-282.
- Zhong C., Hu W.B., Cheng Y.F. (2013) Recent advances in electrocatalysts for electro-oxidation of ammonia, *J. Mat. Chemistry*, 1.
- Zotta, E., Ochoa, F., Yeyati, N. L., & Ibarra, C. (2009). El manejo de la urea y su mecanismo de adaptación durante la enfermedad renal. *Revista de Nefrología, Diálisis y Trasplante*, 29(1), 35-40.

11. Anexos

VOLTAMETRÍA

La voltimetría abarca un grupo de métodos electroanalíticos en los que la información sobre el analito se deduce de la medición de la corriente en función del potencial aplicado, en condiciones que favorezcan la polarización de un electrodo indicador o de trabajo.

Muy relacionada, la amperometría, la corriente proporcional a la concentración del analito se controla a un potencial fijo.

Los electrodos de trabajo poseen áreas superficiales de unos pocos milímetros para favorecer la polarización. La cantidad de muestra utilizada favorece la polarización para el adecuado análisis.

VOLTAMETRÍA CÍCLICA

La respuesta de corriente en un electrodo estacionario pequeño colocado en una solución no agitada es provocada por una señal de potencial de forma de onda triangular. Los voltajes extremos a los cuales tiene lugar la inversión se llaman potenciales de inversión. El intervalo de potenciales de inversión elegido para un experimento dado es aquel en el que tiene lugar la oxidación o la reducción controladas por difusión de uno o más analitos.

Fragmento tomado de: Skoog, *et al.* Principios de análisis instrumental.

CINÉTICA ENZIMÁTICA

Las ecuaciones de Michaelis-Menten y de Hill modelan los efectos de la concentración del sustrato. La **Ecuación de Michaelis-Menten**: Ilustra en términos matemáticos la relación

entre la velocidad de reacción inicial v_i y la concentración de sustrato $[S]$, la ecuación es la siguiente:

$$v_i = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{K_m + [S]}$$

La constante K_m de Michaelis es la concentración de sustrato a la cual v_i es la mitad de la velocidad máxima ($V_{\text{max}} / 2$) alcanzable a una concentración particular de enzima.

Podemos evaluar la ecuación de Michaelis-Menten en tres condiciones.

1. Cuando $[S]$ es mucho menor que K_m

$$v_i \approx \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_m + [S]} \approx \left(\frac{V_{\text{max}}}{K_m}\right)[S] \approx k[S] \quad (1)$$

V_{max} y K_m son constantes, por lo cual, v_i es proporcional a $k[S]$. La velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración de sustrato.

2. Cuando $[S]$ es mucho mayor que K_m

$$v_i \approx \frac{V_{\text{max}}[S]}{[S]} \approx V_{\text{max}} \quad (2)$$

De esta manera la velocidad de reacción es máxima y no está afectada por aumentos adicionales de la concentración de sustrato.

3. Cuando $[S]$ es igual a K_m

$$v_i = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{\text{max}}[S]}{2[S]} = \frac{V_{\text{max}}}{2} \quad (3)$$

La velocidad inicial es de la mitad del máximo. Esta ecuación revela que K_m puede determinarse experimentalmente a partir de la concentración de sustrato a la cual la velocidad inicial es la mitad de la velocidad máxima. Podemos calcular la V_{max} así como la constante de Michaelis Menten para describir la cinética enzimática de nuestro sistema.

La medición directa del valor numérico de V_{max} , y, por consiguiente, el cálculo de K_m , a menudo requiere concentraciones altas poco prácticas de sustrato para alcanzar condiciones de saturación. Una forma lineal de la ecuación de Michaelis-Menten evita esta dificultad, su forma simplificada es la siguiente:

$$\frac{1}{v_i} = \left(\frac{K_m}{V_{max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (4)$$

La ecuación 4 es la ecuación para una línea recta $y = ax + b$. Un gráfico de $1/v_i$ en el eje y, expresado en función de $1/[S]$ en el eje x, da una línea recta cuya intersección en el eje y se define como $1 / V_{max}$ y la pendiente se define como K_m / V_{max} . Este gráfico se conoce como **gráfico del doble recíproco o de Lineweaver-Burk**.

Fragmento tomado de: Murray, R. *et al.* Harper Bioquímica Ilustrada.

En el electrodo de trabajo es donde ocurre la reacción electroquímica de interés, es decir, donde el analito es oxidado o reducido. En nuestro caso, el electrodo de trabajo corresponde a uno de carbón vítreo modificado con el uso de tintas catalíticas preparadas con la composición del electrodo propuesto, correspondiente a la plataforma de carbón nanoestructurada funcionalizada con nanopartículas de Iridio y con la adsorción de la enzima ureasa.

Es posible realizar un estudio cinético enzimático a través de la determinación de V_{max} (constante cinética en estado estacionario) y K_m (constante de Michaelis-Menten) de la enzima libre e inmovilizada y ajustando los datos al modelo Lineweaver-Burk usando el programa *GraphPad Prism*.

IMÁGENES OBTENIDAS DURANTE LA EXPERIMENTACIÓN



Figura 11.1. Comparación de resultados en los ensayos enzimáticos bioquímicos de estabilidad de enzima libre a diferente pH.

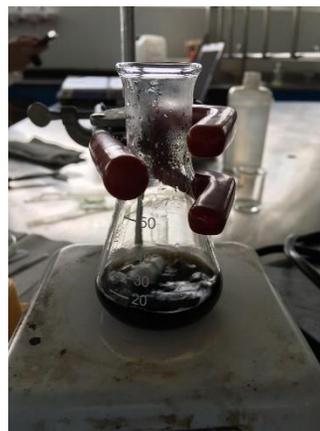


Figura 11.2. Solución de IrNP's (Nanopartículas de Iridio) previa al proceso de obtención por seca

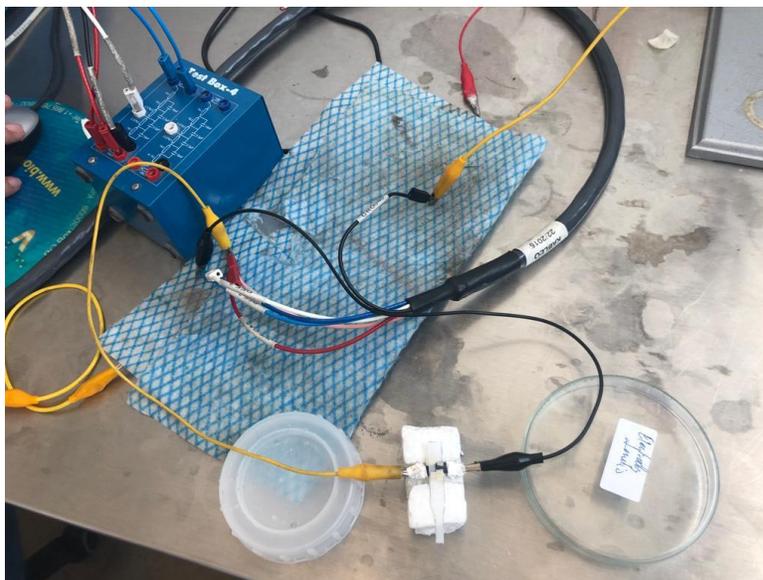


Figura 11.3. Celda de combustible microfluídica conecta a potenciostato.

ANÁLISIS DE PATENTES EXISTENTES Y PRODUCTOS SIMILARES (BENCHMARKING)

El número de publicaciones científicas, revisiones y patentes sobre biosensores desarrollados en los últimos años es muy elevado, lo que refleja el gran interés que despierta este tema en la comunidad científica.

Patentes relacionadas:

4. Biosensor para la medida de fructosa, manera de prepararlo y su aplicación al análisis de fructosa en productos alimenticios. Josefina Parellada, Elena Domínguez y Víctor M. Fernández. España: ES2091714.
5. Enzyme biosensor Hoffmann La Roche (Suiza); Roche Diagnostics GmbH (Alemania) 2003. EP1302545.
6. Biosensors utilizing ligand induced conformation changes Clinical. Micro Sensors Inc. (USA) 2002. US6432723.

En la literatura podemos encontrar otros trabajos relacionados, basándonos en publicaciones científicas podemos encontrar:

Para la detección de urea en la leche Renny, E. F. elaboraron sensor basado en enzimas, fue construido utilizando un sensor piezoeléctrico, que mide la presión del gas que se genera en la muestra. Un estudio con aplicación similar es presentado por Ezhilan, M. En su trabajo desarrollan un biosensor voltamétrico cíclico de acetilcolinesterasa de alta sensibilidad basado en un electrodo de platino (Pt) modificado con nanoesferas de óxido de zinc para la determinación simultánea de melamina y urea en una muestra de leche de vaca.

CONSTANCIAS



CONiIN XVII INTERNATIONAL ENGINEERING CONGRESS

THE QUERÉTARO STATE UNIVERSITY THROUGH THE ENGINEERING FACULTY GRANT THE PRESENT ACKNOWLEDGMENT TO:

Oscar Daniel Jiménez Martínez, Juan de Dios Galindo de la Rosa and Vanessa Vallejo Becerra

General Conference:

Evaluation of nanostructured carbon platforms for the development of urea enzymatic sensors

QUERÉTARO, MEX.
JUNE 2021


Dr. Manuel Toledano Ayala
PRINCIPAL
ENGINEERING FACULTY


Dr. Gonzalo Macías Bobadilla
GENERAL COORDINATOR CONiIN
ENGINEERING FACULTY

La Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería
Delegación Yucatán
otorga la presente

Constancia

SMBB
DELEGACIÓN
YUCATÁN

a:

**Jiménez-Martínez O, Noriega-Vargas M, Ortiz-
Ortega E, Álvarez-López A, Rivas S, Chávez-Ramírez
AU, Galindo de la Rosa J, Vallejo-Becerra V**

por su participación con el trabajo titulado "*Electrodo para
detección de urea en leche de vaca basado en la enzima ureasa
inmovilizada con IrO₂ y carbón nanoparticulado*" en la
modalidad CARTEL, presentado en el **X Congreso de
Biotecnología y Bioingeniería del Sureste** el 10 de Febrero de
2021 a través de medios electrónicos.

Mérida, Yucatán, México, 12 de febrero de 2021



Dr. Juan Sandoval Gio
Presidente de la SMBB Yucatán



Dr. José Efraín Ramírez Benítez
Presidente del Comité Científico X CBBS

Se otorga la presente
CONSTANCIA a:

O. JIMÉNEZ MARTÍNEZ

Por su PARTICIPACIÓN con trabajo en póster digital

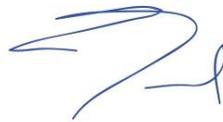
"EFECTO DE LA FUNCIONALIZACIÓN DE PLATAFORMAS DE CARBÓN
NANOESTRUCTURADAS PARA EL DESARROLLO DE SENSORES DE UREA"

en el

**1ER. SIMPOSIO DE TECNOLOGÍAS EMERGENTES
CON APLICACIÓN BIOMÉDICA**

Campus Querétaro

28 de Octubre del 2021.
Santiago de Querétaro, Qro. México.



Dr. Manuel Toledano Ayala
DIRECTOR
FACULTAD DE INGENIERÍA