



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería



Inmovilización de la enzima urato oxidasa para desarrollo de un Biosensor de
Ácido Úrico

Tesis individual para obtener el grado de:
Ingeniero en Nanotecnología

Presenta:

Bryan Modesto Landeros Alamilla

Directora de tesis:

Dra. Janet Ledesma García

Co-director:

Dr. Ricardo Antonio Escalona Villalpando

Santiago de Querétaro, Querétaro.

México



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de
Información



Inmovilización de la enzima urato oxidasa para
desarrollo de un Biosensor de Ácido Úrico

por

Bryan Modesto Landeros Alamilla

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

Clave RI: IGLIN-236211-0323-123



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Ingeniería en Nanotecnología

*“La mejor forma de predecir
el futuro es creándolo.”*

A mis padres: Georgina Alamilla y Modesto Landeros.

A mi hermana: Brenda Landeros.



Agradecimientos

Al Laboratorio Nacional de Micro y Nano fluídica (LabMyN) y a la Universidad Autónoma de Querétaro, por brindarme las instalaciones y herramientas necesarias para el desarrollo de este gran proyecto y permitirme comenzar mi desarrollo profesional.

Al Dr. Ricardo Escalona, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo con uno de sus proyectos, por su apoyo tanto en lo académico como en lo personal. Muchas gracias por sus múltiples consejos y gracias por todos sus aportes profesionales. A la Dra. Janet de igual manera, por hacerme partícipe del equipo de trabajo.

A mis padres, Georgina Alamilla y Modesto Landeros, por ser siempre el motor que me ha impulsado a llegar lejos, por estar en los momentos más difíciles y nunca dejar de apoyarme sin importar las circunstancias. Hoy que concluyo mis estudios, me siento contento de dedicarles este gran logro, sin el apoyo de ustedes no lo hubiera logrado. A mi hermana, de igual forma, sin su apoyo y su cariño no lo hubiera logrado.

A mis mejores amigos de la carrera, Erick Salinas, Alexis Navarrete y Martín Cervantes, por hacer de este viaje una gran aventura, apoyarme en muchas dificultades que se presentaron a lo largo de la carrera. A mis compañeros de laboratorio, Ariadna Reséndiz y Arruan Beristain, por todo el conocimiento brindado y las buenas pláticas en el laboratorio.

A Juan Mellado, por hacerme sentir parte de su familia y enseñarme una gran perspectiva de la vida, por su amistad y todos sus consejos. A Mariana Cuéllar, por todo lo vivido, sus ánimos y el siempre escucharme en los peores momentos.

Infinitas gracias a todos los que fueron partícipes de esta gran aventura.



Resumen

El ácido úrico está relacionado de forma directa e indirectamente con diversas enfermedades, principalmente con la hiperuricemia. En la actualidad, existen métodos de cuantificación para la detección de ácido úrico, sin embargo, estos métodos enfrentan complicaciones como la cantidad de muestra que se necesita y el tiempo para la obtención de los resultados. En el presente trabajo se desarrolló y se realizó la optimización de un biosensor enzimático para la detección de ácido úrico. El biosensor se compone de 3 electrodos, el electrodo de trabajo de papel Toray, electrodo de referencia comercial de Ag/AgCl y contraelectrodo de grafito. La enzima urato oxidasa se inmovilizó a través del método cross-linking, usando como agente de atrapamiento glutaraldehído al 5% y diferentes tipos de materiales de carbón nanoestructurados, los cuales permitieron potenciar la detección de ácido úrico. Los materiales nanoestructurados fueron nanotubos de carbón de pared múltiple carboxilados, nanotubos de carbón de pared múltiple sin funcionalizar y nanofibras de carbón, seleccionando las nanofibras debido a los resultados obtenidos de las pruebas electroquímicas, voltamperometrías cíclicas y cronoamperometrías. En segundo lugar, se optimizaron las concentraciones de enzima y de nanofibras de carbón, obteniendo una concentración ideal de enzima de 10 mg mL^{-1} y de CNF 5 mg mL^{-1} . El límite de detección fue de $0.92 \text{ } \mu\text{M}$, límite de cuantificación de $3.49 \text{ } \mu\text{M}$, la constante de Michaelis Menten de $12.64 \text{ } \mu\text{M}$ y un rango lineal de $0\text{-}1600 \text{ } \mu\text{M}$. Posteriormente, se realizó la evaluación del electrodo de trabajo con diferentes valores de pH, simulando los valores encontrados en fluidos biológicos como sangre, sudor y orina. Esto con la finalidad de observar el comportamiento del biosensor. Las soluciones fueron: buffer Tris-HCl pH 8.8, buffer de fosfato 7.4, buffer de fosfato 5.7 y buffer de acetato 4.5. Los resultados obtenidos fueron similares, sin embargo, se presentó un menor rango lineal en medios ácidos. Las pruebas de interferentes se realizaron en buffer de fosfato 7.4, esto debido a que las evaluaciones finales se planearon realizar en suero. Los interferentes utilizados fueron: glucosa, ácido ascórbico, urea y ácido láctico, ninguno presentó



un porcentaje de interferencia mayor al 10 %. Finalmente, el biosensor fue probado con muestras reales. Se extrajo el suero de sangre de dos voluntarios y se llevó a cabo el análisis de las muestras. La evaluación del voluntario 1 mostró una concentración de ácido úrico en suero de 236 μM , mientras el voluntario 2 mostró una concentración de ácido úrico en suero de 456.69 μM .

Abstract

Uric acid is directly and indirectly related to several diseases, mainly hyperuricemia. Nowadays there are many methods for the detection of uric acid, however, these methods confront complications such as the amount of sample needed and the time to get results. In this work, the optimization of an enzymatic biosensor for the detection of uric acid was developed and accomplished. The biosensor is composed of 3 electrodes, the Toray paper working electrode, Ag/AgCl commercial reference electrode and graphite counter electrode. First the enzyme urate oxidase was immobilized through the cross-linking method, using 5% glutaraldehyde as a trapping agent and different types of nanostructured carbon materials, which allowed enhancing the detection of uric acid. The different types of nanostructured materials such as carboxylated multi-walled carbon nanotubes, unfunctionalized multi-walled carbon nanotubes and carbon nanofibers, selecting the nanofibers due to the results obtained from electrochemical tests, cyclic voltammetry and chronoamperometry. Secondly, the enzyme and carbon nanofiber concentrations were optimized, obtaining an ideal enzyme concentration of 10 mg mL⁻¹ and CNF 5 mg mL⁻¹. The detection limit was 0.92 μM , quantification limit was 3.49 μM , the Michaelis Menten constant was 12.64 μM , and a linear range was 0-1600 μM .a Moreover the evaluation of the working electrode was achieved with different pH values, simulating the values found in biological fluids such as blood, sweat and urine. This in order to observe the behavior of the biosensor. The solutions were: Tris-HCl buffer pH 8.8, phosphate buffer pH 7.4, phosphate buffer pH 5.7 and acetate buffer pH 4.5. The



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Ingeniería en Nanotecnología

results obtained were similar, however, a lower linear range was presented in acid media. The interference tests were put through in phosphate buffer 7.4, this because the final evaluations were planned to be carried out in blood serum. The interferents used were: glucose, ascorbic acid, urea and lactic acid, any solution presented an interference percentage greater than 10 %. Finally, the biosensor was tested with real samples. Serum was extracted from two volunteers and the analysis of the samples was carried out. The evaluation of volunteer 1 showed a serum uric acid concentration of 236 μM , while volunteer 2 showed a serum uric acid concentration of 456.69 μM .



ÍNDICE

1 ANTECEDENTES.....	8
1.1 ÁCIDO ÚRICO	8
1.1.1 <i>Enfermedades relacionadas</i>	9
1.1.2 <i>Métodos de cuantificación</i>	10
1.2 BIOSENSORES.....	13
1.2.1 <i>Biosensores enzimáticos</i>	14
1.2.2 <i>Biosensor enzimático Uricasa</i>	16
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	18
3 JUSTIFICACIÓN.....	19
4 OBJETIVOS.	19
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
5 HIPÓTESIS.....	20
6 METODOLOGÍA.	20
6.1 REACTIVOS Y SOLUCIONES.....	20
6.2 PREPARACIÓN ELECTRODOS DE TRABAJO	21
6.3 OPTIMIZACIÓN ELECTRODOS	21
6.3.1 <i>Materiales de carbón nanoestructurados</i>	21
6.3.2 <i>Enzima y CNF</i>	22
6.3.3 <i>Evaluación pH</i>	22
6.4 CRONOAMPEROMETRÍAS EN AGITACIÓN Y EN PLANO	23
6.5 INTERFERENTES.....	24
6.6 EVALUACIÓN DE BIOSENSOR EN SUERO HUMANO.....	24
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
7.1 NANOPARTÍCULAS DE CARBÓN	25
7.1.1 <i>Inmovilización de UOx con MWCNT-COOH</i>	25
7.1.2 <i>Inmovilización de UOx con MWCNT</i>	28
7.1.3 <i>Inmovilización de UOx con CNF</i>	30
7.1.4 <i>Comparativas nanopartículas</i>	32
7.2 RELACIONES ESTEQUIOMÉTRICAS.....	34
7.2.1 <i>UOx 1 mg mL⁻¹</i>	35
7.2.2 <i>UOx 5 mg mL⁻¹</i>	36
7.2.3 <i>UOx 10 mg mL⁻¹</i>	38
7.2.4 <i>UOx 20 mg mL⁻¹</i>	39
7.2.5 <i>Comparativas concentraciones UOx</i>	41
7.2.6 <i>CNF 1 mg L⁻¹</i>	43
7.2.7 <i>CNF 5 mg L⁻¹</i>	45
7.2.8 <i>CNF 10 mg L⁻¹</i>	46
7.2.9 <i>CNF 20 mg L⁻¹</i>	48
7.2.10 <i>Comparativas concentraciones CNF</i>	50
7.3 EVALUACIÓN A DIFERENTE PH.....	51
7.3.1 <i>pH 7.4</i>	52



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Ingeniería en Nanotecnología

7.3.2	<i>pH 5.7</i>	53
7.3.3	<i>pH 4.5</i>	54
7.3.4	<i>Comparativas a diferentes valores de pH</i>	56
7.3.5	<i>Cronoamperometría estática</i>	57
7.4	INTERFERENTES.....	60
7.4.1	<i>Cronoamperometría estática en plano</i>	61
7.5	EVALUACIÓN DE BIOSENSOR EN SUERO SANGUÍNEO HUMANO.....	63
7.5.1	<i>Voluntario 1</i>	63
7.5.2	<i>Voluntario 2</i>	65
8	CONCLUSIONES	68
9	PERSPECTIVAS	69
10	BIBLIOGRAFÍAS	71
11	ANEXOS	75

1 Antecedentes.

1.1 Ácido Úrico

El ácido úrico es un componente orgánico heterocíclico (fórmula científica $C_5H_4N_4O_3$) con un pKa de 5.75 y un peso molecular de 168 Da (Figura 1), este es producido endógenamente por humanos y animales como un metabolito de purina. Se encuentra principalmente como urato monosódico, a un pH fisiológico (7.4), es producido por el hígado y principalmente excretado por los riñones e intestinos [1][2].

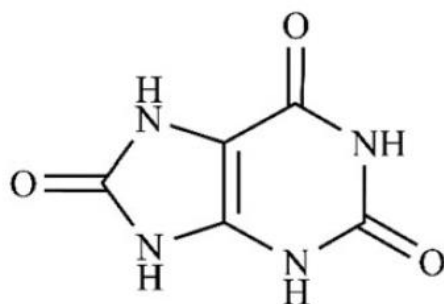


Figura 1: Estructura del ácido úrico.

Los niveles adecuados de ácido úrico dentro de la sangre humana son de 1.5 a 6.0 mg/dL en mujeres y de 2.5 a 7.0 mg/dL en hombres. Al encontrarse principalmente como urato, éste presenta una baja solubilidad en el agua de igual forma que en la sangre, alcanzando altas concentraciones. El promedio de concentración de ácido úrico en la sangre es de 6.8 mg/dL, siendo éste el límite de solubilidad. Los humanos no somos capaces de oxidar el ácido úrico a un componente más soluble, alantoína, debido a la falta de la enzima urato oxidasa [3].

Se ha demostrado que el ácido úrico tiene efectos benéficos dentro del humano; uno de ellos es la gran capacidad antioxidativa que tiene en la sangre reduciendo el daño generado por radicales libres. También tiene efectos positivos en la respuesta inmune e inflamación. Sin embargo, son más los efectos negativos que se tienen registrados cuando existe una alta concentración de ácido úrico en la sangre. El



exceso de esta sustancia está relacionado con diversas enfermedades metabólicas y enfermedades cardiovasculares [4].

1.1.1 Enfermedades relacionadas.

El exceso de ácido úrico en sangre es conocido como hiperuricemia, que está relacionada principalmente con la hipertensión y la enfermedad renal diabética. La hiperuricemia es conocida como un contaminante del síndrome metabólico, la cual desencadena enfermedades como obesidad abdominal, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, dislipidemia e hipertensión [5].

Generalmente, la hiperuricemia en adultos es considerada a una concentración en sangre mayor a 7.0 mg/dL en hombres y 6.0 mg/dL en mujeres [3]. Se tienen contemplados muchos factores para explicar el aumento del ácido úrico, dichos factores están relacionados a la dieta y estilo de vida de cada individuo, la edad, entre otros factores [1].

1.1.1.1 Gota

La gota es causada por de cristales de urato monosódico en articulaciones después de tener hiperuricemia crónica. Suele presentarse de forma brusca, los síntomas y signos inflamatorios aparecen entre las 12 o 24 horas. Este mal afecta entre el 1-2 % de los adultos en países desarrollados [2][6][7].

1.1.1.2 Cálculo renal

Los cálculos renales son formados por sales de calcio depositadas en una matriz orgánica de oxalato o de urato. Los cálculos renales pueden afectar cualquier parte de las vías urinarias, desde los riñones hasta la vejiga. El ácido úrico juega un importante rol en la formación de cálculos renales, causando el fallo renal progresivo [2][8].



1.1.1.3 Síndrome metabólico

El ácido úrico está relacionado con este síndrome y sus componentes, como lo es la obesidad, la resistencia a la insulina y otros factores para daños cardiovasculares. Aunque la hiperuricemia no es el causante directo del síndrome metabólico, el riesgo de desarrollar este tipo de enfermedades aumenta considerablemente [2][9].

1.1.1.4 Enfermedades cardiovasculares

La relación que se tiene entre los niveles altos de ácido úrico en la sangre y las enfermedades cardiovasculares es muy estrecha. Aunque la hiperuricemia no sea la causante principal de dichas enfermedades, es un hecho que el riesgo aumenta al presentar hiperuricemia [1]. El ácido úrico provoca disfunción endotelial al aumentar el estrés oxidativo, lo que afecta a la cardiopatía coronaria [10].

1.1.2 Métodos de cuantificación

Como se ha mencionado anteriormente, es importante conocer la concentración de ácido úrico en nuestro organismo por ser un indicador de salud, debido a que estos niveles pueden desencadenar diferentes tipos de enfermedades. Existen diversas estrategias y métodos para la detección de ácido úrico, una de las clasificaciones puede ser por el tipo de tecnología. Para su detección se puede incluir técnicas espectrofotométricas, como ultra-violeta (UV) o fluorescencia, técnicas electroquímicas, cromatografías, electroforesis capilar, principalmente [11].

1.1.2.1 Detección espectral (UV y fluorescencia)

Estos son métodos colorimétricos basados en la detección de ácido úrico mediante la enzima urato oxidasa. Este seguimiento puede realizarse a través del ácido úrico o por el peróxido generado durante la reacción enzima-sustrato. Ambos métodos son estables y reproducibles, la problemática es mantener a la enzima estable durante las reacciones generadas, causando procesos de inactivación de esta misma [11].

1.1.2.2 Detección cromatográfica

HPLC (highperformance liquid chromatography) tiene una alta eficiencia, buena selectividad y alta sensibilidad de detección. En esta técnica se puede medir el ácido úrico en muestras de saliva o muestras nasales. Detectores de HPLC para ácido úrico incluyen un conjunto de diferentes técnicas, como absorción UV, técnicas electroquímicas y espectroscopía de masas[11].

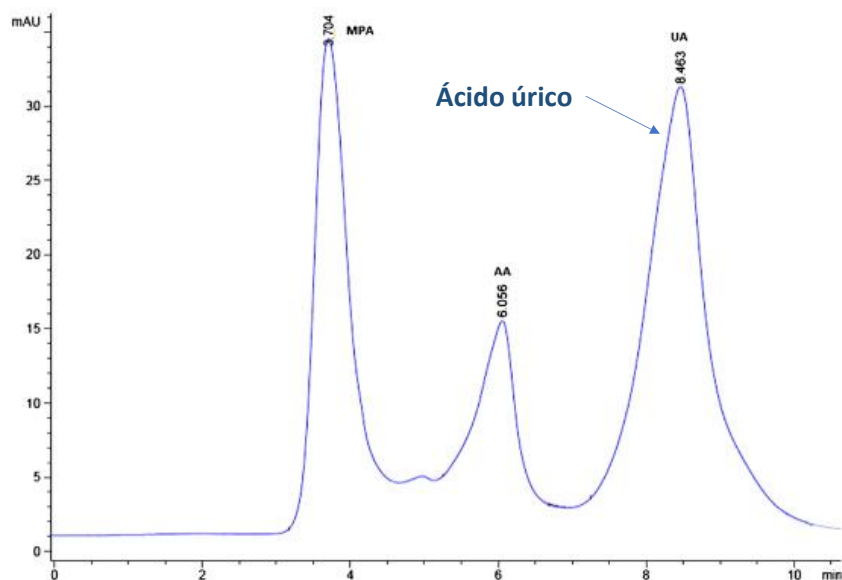


Figura 2 HPLC de diferentes muestras que incluye el ácido úrico.

El método mayormente utilizado para la detección de ácido úrico es el agente colorimétrico tetrametilbenzidina (TMB). El ácido úrico es oxidado por la enzima uricasa en una solución acuosa donde se produce peróxido, esto cataliza la oxidación de TMB para generar TMB_{ox}. Este último compuesto producido tiene un color azul característico, el cual es fácil de detectar a simple vista o con un detector UV.

1.1.2.3 Detección electroquímica

Las técnicas electroquímicas han sido aplicadas para la determinación de diferentes tipos de analitos en una gran variedad de matrices. Este tipo de métodos son relativamente rápidos frente a otro tipo de estrategias. El ácido úrico puede ser

fácilmente oxidado mediante electrodos en solución acuosa, dando como resultado alantoína, un componente que facilita su detección.

La oxidación electroquímica del ácido úrico ha sido estudiada bajo varias condiciones a diferentes valores de pH. Cuando se tiene un sensor no enzimático, se busca que la oxidación del ácido úrico se inicie con 2 electrones y 2 hidrógenos, resultando una diimina inestable, obteniendo como producto final la alantoína. La clave de esta reacción está en la absorción del urato en el electrodo. Para una mayor facilidad de reconocimiento del urato en el electrodo, se realizan modificaciones en los electrodos con nanomateriales, polímeros conductores, entre otros [11].

1.1.2.4 Detección enzimática basada en Uricasa.

Los métodos enzimáticos basados en la enzima uricasa, o urato oxidasa (UOx), son de los más comunes. Existen dos formas de medir la concentración de ácido úrico, el primer método consiste en cuantificar el ácido por absorbancia a 293 nm, mientras que el segundo método, mejor conocido como método indirecto, cuantifica el peróxido de hidrógeno producido por la enzima [12].

1.1.2.4.1 Método directo de Uricasa

El ácido úrico tiene una fuerte y distintiva absorbancia a 293 nm, gracias a esto es sencillo de medir en una muestra de suero. Una de las problemáticas que tiene este método es la interferencia de otras sustancias que se encuentran en el suero [12].

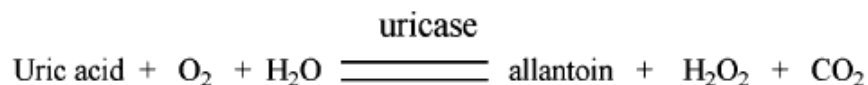


Figura 3: Reacción enzimática Uricasa-ácido úrico.

1.1.2.4.2 Método indirecto de uricasa

En este método se cuantifica el peróxido de hidrógeno generado después de haber reaccionado la enzima uricasa con el ácido úrico. El peróxido puede tener seguimiento mediante dos procedimientos: por métodos espectrofotométricos y por

métodos electroquímicos. Sin embargo, se han desarrollado mejores sistemas de detección, donde la enzima es inmovilizada para una mejor reacción entre ésta y la sustancia a detectar. Estos sistemas son conocidos como biosensores enzimáticos [12].

1.2 Biosensores

Un biosensor es definido como un dispositivo analítico que combina un componente biológico con un dispositivo fisicoquímico para la detección de un analito de importancia biológica. Básicamente, consiste en un dispositivo que reconoce una sustancia biológica, la cual interactúa con una molécula y a través de un transductor, es posible obtener una señal eléctrica, como se muestra en la Figura 4 [13] [14].

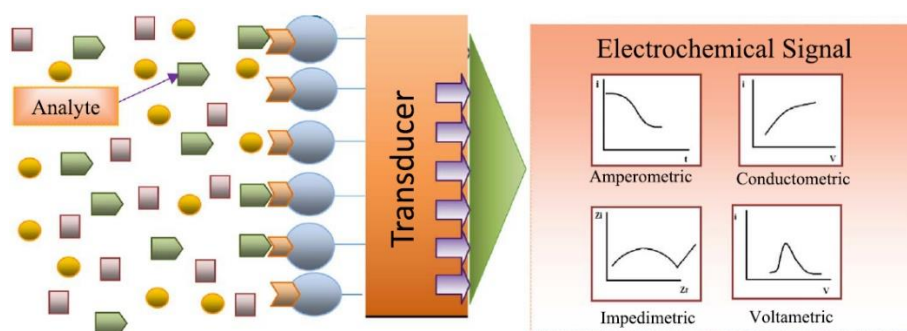


Figura 4: Representación esquemática de un biosensor.[15]

La alta especificidad de los biosensores depende directamente del receptor utilizado. Dos de los principales problemas que se desarrollan en estos dispositivos son la incorporación inmovilización de la biomolécula, la cual cumple la función de receptor, y la cuantificación de la interacción entre el analito y el receptor [15].

Diferentes tipos de elementos de reconocimiento son utilizados en los biosensores para obtener una buena especificidad y sensibilidad de la sustancia a detectar, como se muestra en la Figura 5. Partiendo del hecho que el ácido úrico es detectado mediante métodos enzimáticos, resulta de gran interés los biosensores enzimáticos debido a la selectividad y sensibilidad de éstos.

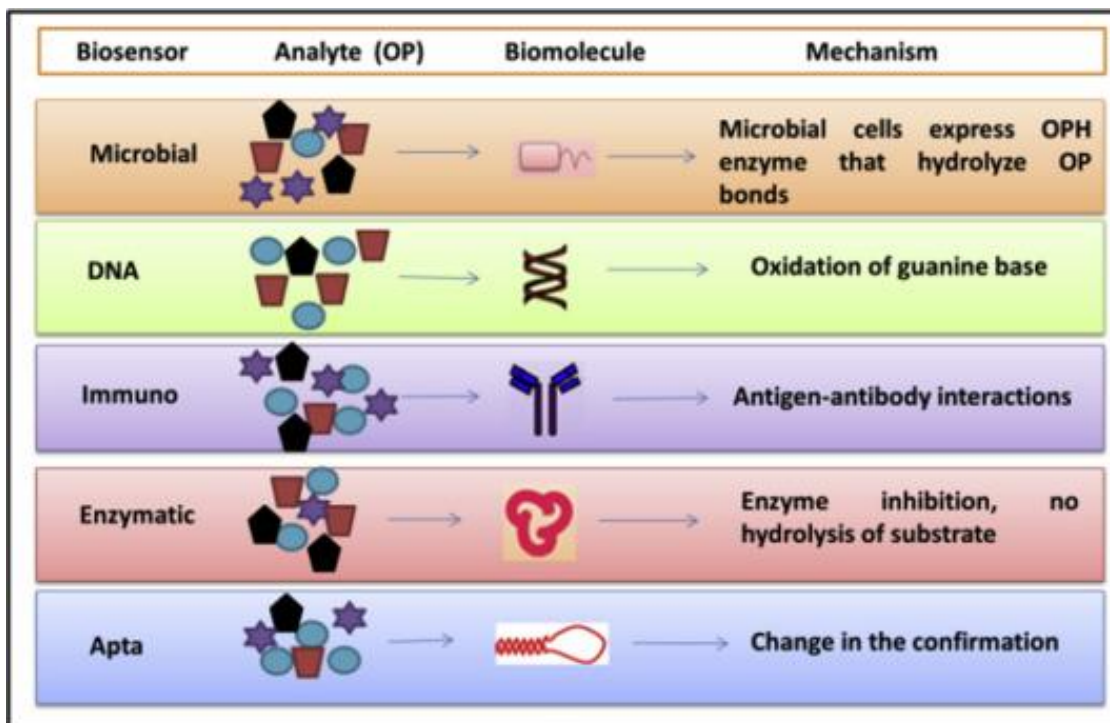


Figura 5: Principales biosensores basados en diferentes biomoléculas [16].

1.2.1 Biosensores enzimáticos

En un biosensor enzimático, la enzima es utilizada como el elemento de reconocimiento y su inmovilización se realiza mediante una matriz en la superficie del transductor. Las ventajas de usar enzimas es la alta especificidad debida a la interacción enzima-sustrato[17]. Estas ventajas están determinadas de forma directa por el método de inmovilización a seguir, a causa de que puede ser benéfico o contraproducente para la enzima, y en general, para la reacción [18].

Dicho método es capaz de modificar la respuesta enzimática, la sensibilidad, entre otros factores, afectando la respuesta del biosensor. La enzima es inmovilizada desde diferentes técnicas, como una adsorción física, unión covalente, encapsulación o la técnica cross-linking [15] .

1.2.1.1 Métodos de inmovilización

Una parte importante que se considera dentro de los biosensores es la transferencia de electrones entre el sitio activo de la enzima y el electrodo. Esta transferencia es clasificada en 3 tipos de generaciones como se muestra en la siguiente ilustración.[18]

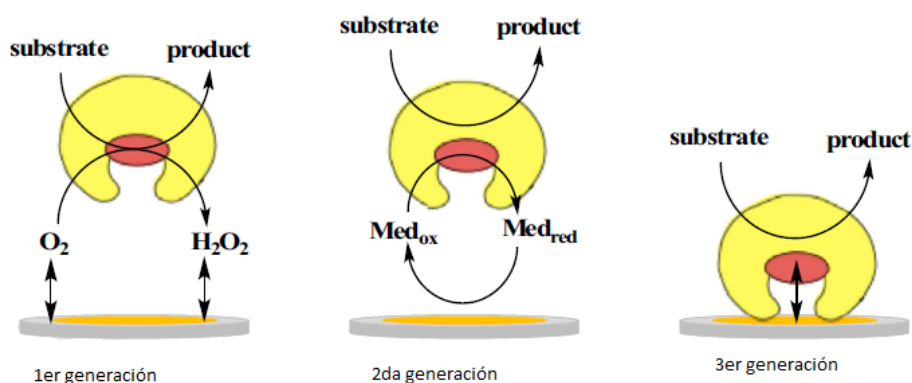


Figura 6: Representación esquemática de la transferencia de electrones en biosensores.[19]

- En la primera generación, la reacción es totalmente dependiente de la presencia de oxígeno [20].
- En la segunda generación, se usan mediadores como intermediarios para producir la transferencia de electrones entre el sitio activo y el electrodo.
- En la tercera generación, la transferencia de electrones es directa entre el sitio activo y el electrodo [21].

1.2.1.1.1 Adsorción física

Es una técnica simple y en este proceso, la enzima no se ve afectada debido a que no hay reacciones químicas. Biosensores construidos con esta estrategia tienen mejores parámetros operacionales y alta estabilidad [21].

1.2.1.1.2 Adsorción covalente

Esta técnica es realizada por una reacción química, también considera la técnica más efectiva para conseguir una estabilidad. La modificación de la superficie del

electrodo con péptidos, permite controlar la orientación de la enzima, de esta manera se consigue una alta sensibilidad y selectividad [22].

1.2.1.1.3 Inmovilización por atrapamiento

El uso de polímeros en esta técnica es muy común, aparte de ser sencilla de controlar el diseño desde la enzima, el mediador y los aditivos que pueden ser depositados en el biosensor [21].

1.2.2 Biosensor enzimático Uricasa

Con la enzima urato oxidasa como la especie de reconocimiento, el biosensor responde selectivamente al ácido úrico. La enzima cataliza la oxidación de ácido úrico y da como producto alantoína [23] [24].

Al oxidarse el ácido úrico, se forma peróxido de hidrógeno en el electrodo de trabajo. Sin embargo, la oxidación del H_2O_2 toma lugar en potenciales mayores a 0.4 v, provocando interferencias de otros metabolitos como el ácido ascórbico y varios aminoácidos con el mismo potencial de oxidación. Esta interferencia generada por otros compuestos puede ser reducida con el uso de mediadores electroquímicos [25].

La formación del H_2O_2 es detectada por el método de corriente amperométrica durante la oxidación en el electrodo:

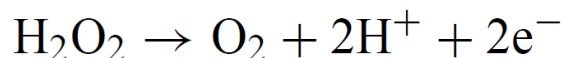


Figura 7: Oxidación del peróxido de hidrógeno.[26]

1.2.2.1 Características de la enzima Uricasa

Uricasa o urato oxidasa (EC 1.7.3.3) es una enzima que cataliza la oxidación del ácido úrico a 5-hidroxiisorato y peróxido de hidrógeno. Posteriormente una hidrólisis y una descarboxilación permite o da lugar a la formación de la alantoína [27]. La enzima es producida por organismos que incluyen bacterias, hongos, plantas y

animales excepto los homínidos. Entre estas fuentes, los microbios se utilizan preferentemente para la producción de enzimas debido a su simplicidad en la producción, purificación y optimización de procesos [28].

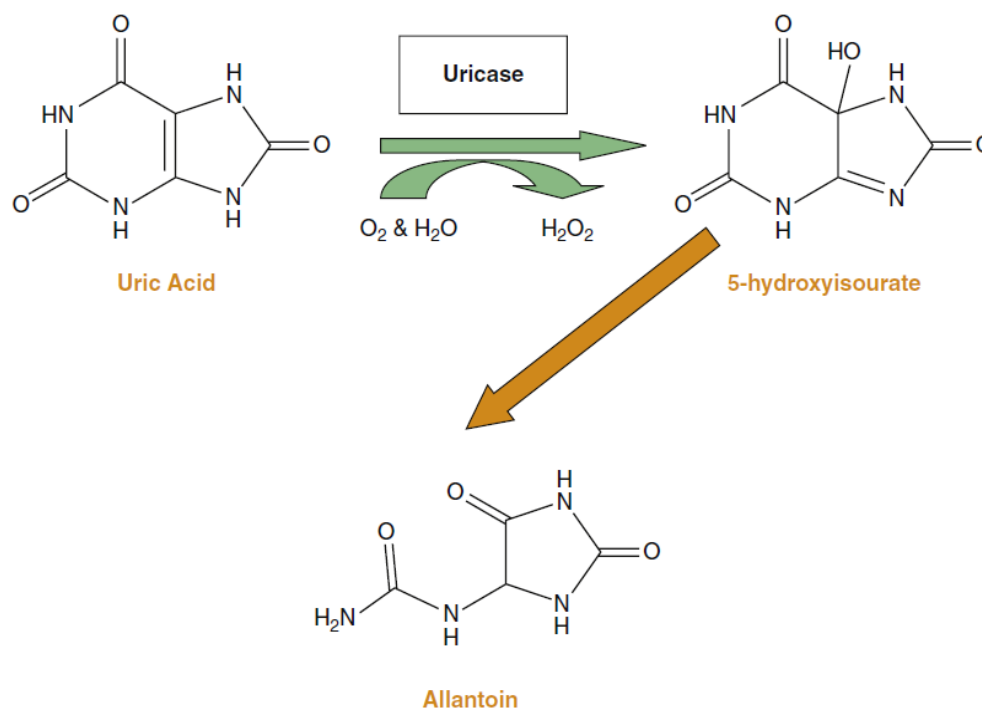


Figura 8: Proceso de la degradación de ácido úrico a alantoína mediante la Uricasa. [27].

La enzima Uricasa, de *Candida sp*, consiste en dos tetrámeros compuesto de cuatro subunidades idénticas. Cada subunidad de la Uricasa contiene 287 residuos de aminoácidos y consiste en 4 α -hélices. Un túnel cilíndrico con un diámetro de 30 Å y con una longitud de 80 Å puede ser encontrado en el centro de la enzima [29][30].

La mayoría de las enzimas que utilizan oxígeno molecular como sustrato usualmente requieren de algún cofactor o mediador electroquímico con O_2 . Se tiene contemplado que en algunos estudios que la actividad enzimática no contiene metales de transición y cofactores orgánicos o aminoácidos modificados [21][22].

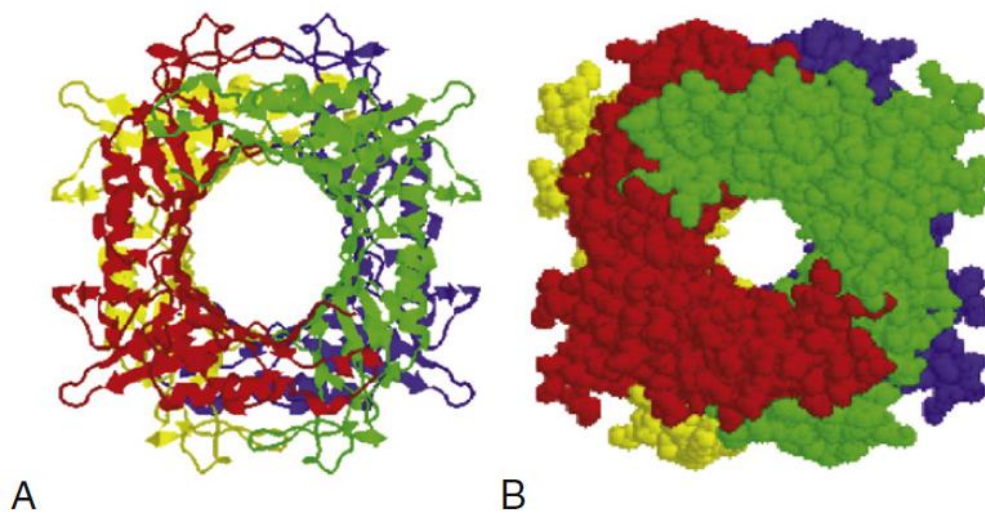


Figura 9: Modelo molecular del tetrámero Uricasa basado en su estructura cristalina. Cada subunidad es mostrada en un color diferente [27].

2 Planteamiento del Problema.

El ácido úrico está relacionado de forma directa e indirectamente con diversas enfermedades, principalmente con la hiperuricemia. En la actualidad, existen métodos de cuantificación para la detección de ácido úrico, sin embargo, estos métodos enfrentan complicaciones como la cantidad de muestra que se necesita y el tiempo para la obtención de los resultados.

Con lo anterior, se propone realizar diferentes métodos de inmovilización de la enzima en diferentes condiciones de reacción, para encontrar una optimización del biosensor. De esta forma se planea obtener una respuesta eficiente y con mayor rapidez de los niveles de ácido úrico, así como un menor límite de detección y cuantificación, mayor sensibilidad, alta selectividad y reproducibilidad. Todos estos resultados serán comparables o superiores con lo que se encuentra reportado en la literatura.



3 Justificación.

El propósito de este proyecto es diseñar un biosensor enzimático que sea capaz de cuantificar concentraciones de ácido úrico en fluidos biológicos, como la sangre, suero e incluso sudor de manera instantánea y de forma inalámbrica, para obtener información importante y poder prevenir enfermedades producidas por los niveles altos de ácido úrico.

Para cumplir nuestro objetivo, se propone realizar un biosensor con la inmovilización de la enzima urato oxidasa, de esta manera se determinarán concentraciones de ácido úrico en diferentes muestras para realizar una detección inmediata y confiable, evitando el desarrollo o complicaciones de enfermedades provocadas por la hiperuricemia.

4 Objetivos.

Desarrollar un biosensor amperométrico empleando la enzima UOx inmovilizada con materiales de carbón nanoestructurados, con el fin de cuantificar el ácido úrico en los rangos encontrados en fluidos biológicos, como sangre, sudor y saliva.

4.1 Objetivos específicos.

1. Inmovilizar la enzima urato oxidasa utilizando materiales de carbón nanoestructurados mediante el método cross-linking y caracterizarlos electroquímicamente con cronoamperometrías y voltamperometrías cíclicas,
 2. optimizar las condiciones de reacción de los electrodos de trabajo como el pH, concentración de enzima y concentración de nanopartículas de carbón para la cuantificación de ácido úrico,
 3. evaluar la selectividad del biosensor mediante sustancias interferentes y evaluar la reproducibilidad a través de la desviación estándar.
-



4. Realizar detección en muestras reales como sangre y sudor mediante cronoamperometrías, la cuales nos permitan conocer la concentración de ácido úrico a través de curvas de calibración.
-

5 Hipótesis.

La optimización de la inmovilización de la enzima urato oxidasa variando las relaciones estequiométricas de la enzima, de los materiales de carbón nanoestructurados, así como el pH y método de evaluación, permitirá una mayor respuesta catalítica y estabilidad del biosensor amperométrico para la cuantificación del ácido úrico.

6 Metodología.

6.1 Reactivos y soluciones

Enzima urato oxidasa (UOx) de *Candida sp.*, ácido úrico (AU), glutaraldehído, etanol, ácido ascórbico (AA), ácido láctico (AL), glucosa, tris(hidroximetil)aminometano (Tris), ácido clorhídrico (HCl), nanotubos de pared múltiple (MWCNT), nanotubos de pared múltiple carboxilados (MWCNT-COOH) y nanofibras de carbón (CNF) se obtuvieron de Sigma. Fosfato de sodio monobásico, fosfato de potasio, acetato de sodio y ácido acético se obtuvieron de J. T. Baker.

Se prepararon soluciones buffer a diferentes valores de pH. Solución buffer Tris-HCl 0.1 M (pH 8.8) se preparó disolviendo 6.05 g de Tris en 500 mL de agua destilada. Solución buffer de fosfato (PBS) 0.1 M (pH 7.4) se preparó disolviendo 1.14 g de fosfato de potasio y 10.87 g de fosfato de sodio monobásico en 500 mL de agua destilada. PBS 0.1 M (pH 5.7) se preparó disolviendo 5.6 g de fosfato de potasio y



0.873 g de fosfato de sodio monobásico en 500 mL de agua destilada. Solución buffer de acetato (pH 4.5) se preparó disolviendo 2.5 g de acetato de sodio en 500 mL de agua destilada, agregando 1.8 mL de ácido acético. Una solución 10 mM de ácido úrico se preparó disolviendo 0.17 g en 100 mL de buffer Tris-HCl para realizar evaluaciones de los electrodos de trabajo.

6.2 Preparación electrodos de trabajo

Para la preparación de los electrodos, se siguió la técnica de inmovilización cross-linking con 3 tipos de nanopartículas [31][32][33][34]. Para estos electrodos, la base fue papel de carbón toray, el cual se cortó con las dimensiones 0.3 cm x 3 cm. Primero fue con MWCNT-COOH, 1 mg UOx se disolvió en 70 μ L de Tris-HCl, después se agregó 30 μ L de glutaraldehído al 5%. Posteriormente, se añadió 100 μ L de etanol a la solución y se trasvasó al tubo de MWCNT-COOH. Se sonicó durante 15 minutos y cada 2 minutos se agitó en el vortex. Finalmente, se colocó 15 μ L en un área de 9 mm² del carbón toray y se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 hr. Los otros dos nanomateriales fueron MWCNT y CNF, siguiendo el mismo procedimiento para la inmovilización.

6.3 Optimización electrodos

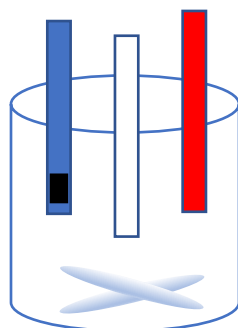
Todos los experimentos se realizaron tres veces. Los electrodos fueron evaluados con ácido úrico en solución buffer previamente preparados con diferentes valores de pH. Se evaluaron diferentes relaciones entre enzima y los nanomateriales.

6.3.1 Materiales de carbón nanoestructurados

Para realizar las evaluaciones de cada nanopartícula, se realizaron voltamperometrías cíclicas y cronoamperometrías para observar el comportamiento y la obtención de corriente[34]. En primer lugar, se evaluaron MWCNT-COOH, posteriormente MWCNT y por último CNF. Las pruebas se realizaron con la ayuda

de un potenciostato/galvanostato (Biologic), los electrodos se colocaron dentro de un vaso de precipitados con 5 mL de buffer, como se muestra en la Figura 10. Para las amperometrías se agregaron concentraciones de ácido úrico de 10 μM , desde 0 hasta una concentración final de 100 μM , todo el tiempo en agitación.

Figura 10 Esquema del biosensor para la evaluación del electrodo de trabajo en amperometría. El electrodo de trabajo en color azul, electrodo de referencia en color



blanco y contraelectrodo en color rojo.

6.3.2 Enzima y CNF

Una vez obtenida la nanopartícula con los mejores resultados de nuestro interés, se procedió a realizar la variación de las concentraciones, tanto de enzima UOx, como de la nanopartícula seleccionada. En ambas partes, fue desde una concentración de 0.5 mg 100 μL^{-1} hasta 2 mg 100 μL^{-1} , en intervalos de 0.5 mg 100 μL^{-1} .

6.3.3 Evaluación pH

Tabla 1 Ácido úrico en fluidos biológicos

Fluido	Concentración en sangre	pH
Sangre	120-380 μM	7.4
Orina	1400 - 4700 μM	4.6 - 8
Sudor	4.2 - 4800 μM	4.5
Saliva	200 μM	5.6 - 7.9
Lágrimas	326 μM	7.4

Finalmente, se hizo la evaluación del electrodo de trabajo en las diferentes soluciones buffer (PBS y buffer de acetato). Con cada uno se realizaron cronoamperometrías en condiciones iguales. Se consideraron estos valores de pH a causa de que se encuentran los fluidos del cuerpo humano, en sangre y sudor. Se realizaron cronoamperometrías en estado estático para observar el tiempo de respuesta del biosensor.

6.4 Cronoamperometrías en agitación y en plano

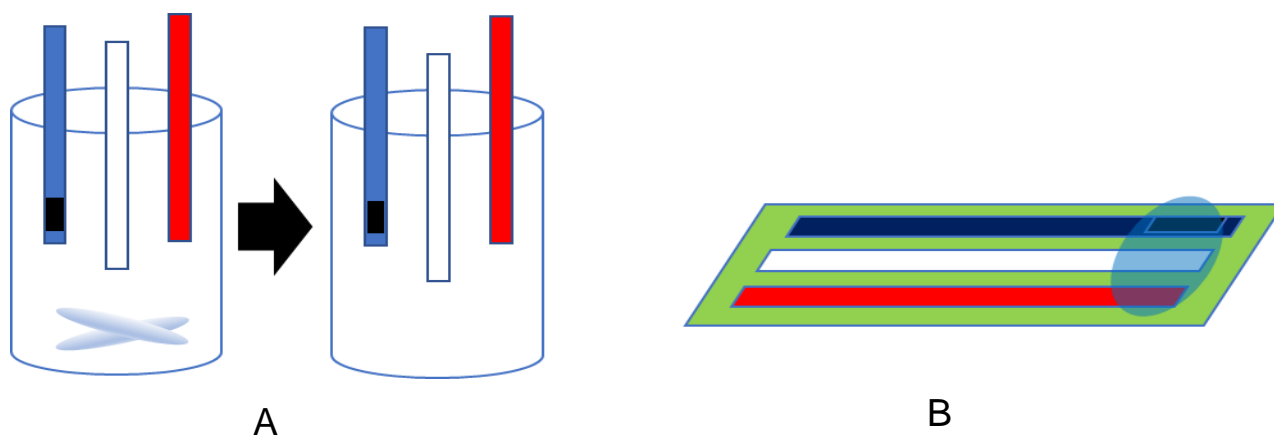


Figura 11 Esquema del biosensor para la evaluación de estática en agitación (A) y en plano (B). El electrodo de trabajo en color azul, electrodo de referencia en color blanco y contraelectrodo en color rojo.

Una vez obtenidos los electrodos de trabajo, se realizaron dos tipos de pruebas en estática. En la Figura 11-A, se muestra el esquema en agitación, donde al agregar alícuotas de AU, se agita durante 5 segundos, posteriormente se detiene la agitación y se realiza la cronoamperometría durante 300s.

Para la cronoamperometría en agitación, los electrodos se fijaron mediante cinta adhesiva para evitar contactos no deseados entre éstos. El electrodo de referencia comercial fue de Ag/AgCl y se agregó una muestra de 200 μ L en cada evaluación a diferentes concentraciones de ácido úrico, corriendo las cronoamperometrías durante 300 segundos, con un voltaje de trabajo de 0.35 V.



6.5 Interferentes

Esta prueba se realizó para evaluar diferentes sustancias que se encuentran principalmente en sangre, es por ello, que se evaluaron las concentraciones mostradas en la Tabla 2, a un pH de 7.4. Se corrieron pruebas amperométricas, donde se agregaron alícuotas de cada sustancia para observar los aumentos de corriente con cada adición. En primer lugar, se agregó una alícuota de ácido úrico 100 μM , posteriormente se agregaron el resto de los interferentes y se observó el comportamiento del electrodo de trabajo. Finalmente se agrega nuevamente ácido úrico.

Tabla 2 Interferentes que se encuentran en sangre.

Interferente	Concentración en sangre	Concentración utilizada
Ácido úrico	120-380 μM	200 μM
Ácido ascórbico	30-90 μM	60 μM
Glucosa	6.6 mM	6 mM
Urea	2-8 mM	6 mM
Ácido láctico	1-2 mM	2 mM

6.6 Evaluación de biosensor en suero humano

Finalmente se realizaron dos pruebas con muestras reales para comprobar el funcionamiento del biosensor. Las muestras reales fueron extraídas de dos voluntarios, el dr. Ricardo Antonio Escalona Villalpando y Bryan Modesto Landeros Alamilla. En primer lugar, se obtuvieron 5 mL de sangre de los voluntarios, posteriormente se obtuvo el suero, el cual fue evaluado. Las evaluaciones de las muestras se realizaron de dos formas, en agitación y en estática, considerando un factor de dilución igual a 2.

7 Resultados y discusión

7.1 Nanopartículas de Carbón

En previos estudios se obtuvo que el potencial de trabajo para un biosensor con Uricasa se encuentra entre 0.2 y 0.4 V. Al realizar las voltamperometrías cíclicas, se observó el pico de oxidación entre 0.2 y 0.4 V, lo cual nos proporcionó nuestro potencial de trabajo para realizar las cronoamperometrías.

7.1.1 Inmovilización de UOx con MWCNT-COOH

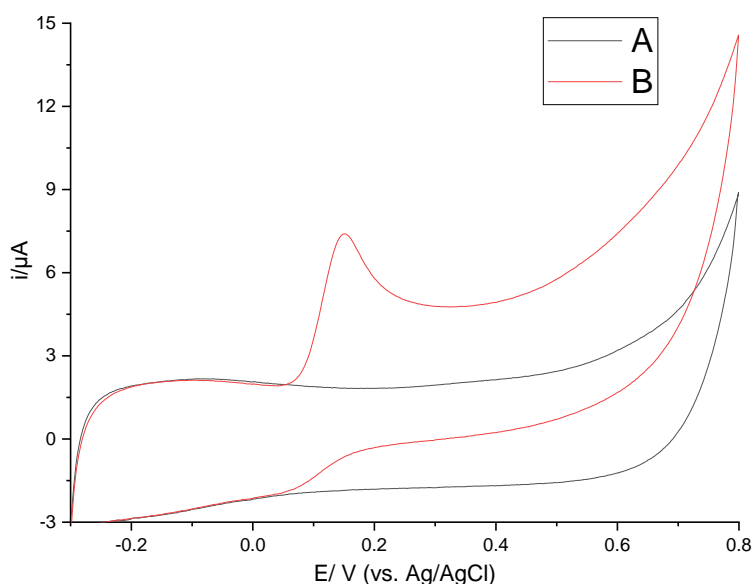


Figura 12 (A) VC sin adiciones de ácido úrico. (B) VC con una concentración de ácido úrico 1500 μM . Ambas en buffer Tris-HCl (pH 8.8.)

En la Figura 12 se observa dos voltamperometrías cíclicas (VC) en un rango entre de -0.3 V a 0.8 V (vs. Ag/AgCl) en buffer Tris-HCl de pH 8.8, con una velocidad de muestreo a 0.01 V s^{-1} . La Figura 12-A, sin ácido úrico, se observó el perfil electroquímico propio del carbón y se obtuvo una corriente de 1.18 μA . En la Figura 12-B, con la adición de 1500 μM de ácido úrico, se observó el pico de oxidación a 0.15 V, con una corriente de 7.4 μA (1.16 V), por lo que el diferencial de corriente



fue de 5.56 μA . Este pico indica la oxidación del H_2O_2 generado en la oxidación de AU (como se mencionó en la reacción general) y se observa un ligero desplazamiento hacia la izquierda, este desplazamiento es debido a la presencia de los nanotubos de carbón, los cuales facilitan la obtención de los electrones desde el sitio activo de la enzima, permitiendo utilizar un menor voltaje de trabajo [25].

En presencia de ácido úrico, las corrientes pico anódicas aumentan considerablemente, como se esperaba para un mecanismo catalítico, indicando que la enzima se encuentra activa. De igual forma estos resultados demuestran que el sitio activo de la enzima corresponde a nuestro analito y conserva su actividad catalítica después de ser sonicada para la preparación del electrodo de trabajo.

En la Figura 13-A, se muestra una cronoamperometría con un voltaje de trabajo de 0.3 V (vs. Ag/AgCl) con adiciones sucesivas de ácido úrico. Se puede observar que la respuesta del electrodo de trabajo es de forma rápida y sensible a bajas corrientes, la cual se puede atribuir al contacto que existe entre MWCNT-COOH y la enzima, dicha respuesta llega hasta una concentración de ácido úrico de 1500 μM .

En la Figura 13-B, se muestra la curva de calibración del electrodo de trabajo UOx/MWCNT-COOH, donde se calculó una regresión lineal para obtener la linealidad de la curva, arrojando una R^2 de 0.99. Sin embargo, se puede observar por encima de concentración de 900-1000 μM los valores de las corrientes son más dispersos. Una vez obtenida la ecuación de la curva, se pudo obtener el límite de detección igual a 3.87 μM y una sensibilidad de 0.12 A M^{-1} , lo cual se consideraría un excelente resultado, en comparación a los mostrados en otros artículos [25]. También se obtuvo el límite de cuantificación igual a 12.89 μM y una K_m de 1.26 μM , indicando una gran afinidad entre la enzima UOx y el sustrato.

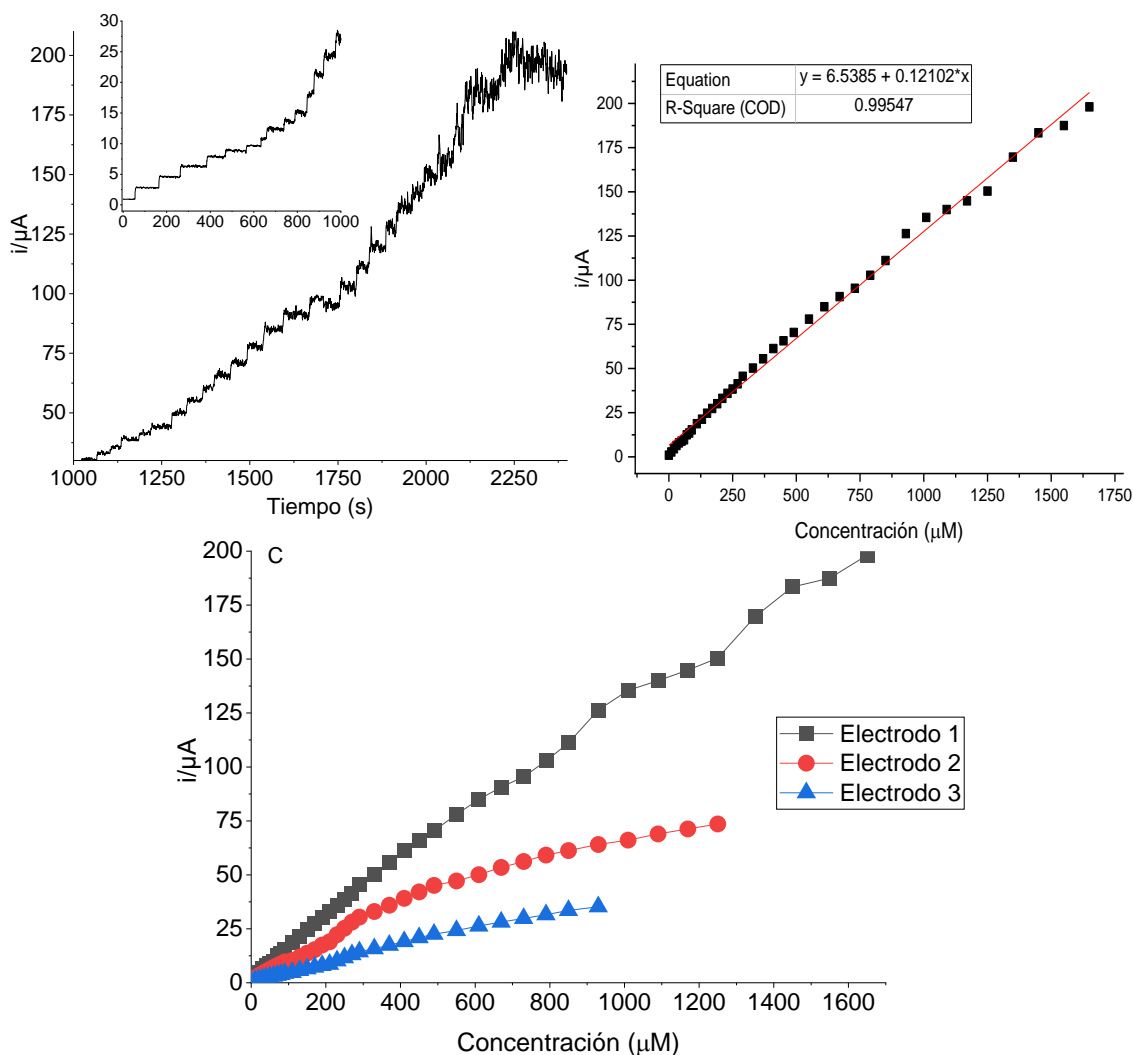


Figura 13 (A) Respuesta amperométrica del electrodo de trabajo UOx/MWCNT-COOH con adiciones de ácido úrico, desde una concentración de $0 \mu\text{M}$ hasta $1500 \mu\text{M}$. (B) Curva de calibración del electrodo de trabajo UOx/MWCNT-COOH , mostrando corriente obtenida a diferentes concentraciones. (C) Comprobación de reproducibilidad nula con MWCNT-COOH .

Se intentó realizar el triplicado de este electrodo de trabajo, desafortunadamente no se logró debido a que una vez dejando secar durante 24 horas, la mezcla colocada se desprendía del papel Toray, como se observa en la Figura 13-C, la corriente obtenida en los diferentes electrodos fue muy dispersa y sin algún tipo de tendencia. Es por ello que se tuvo que descartar la opción de usar estos MWCNT-COOH .

7.1.2 Inmovilización de UOx con MWCNT

Como segunda opción de nanopartícula de carbón, se evaluaron los nanotubos de carbón de pared múltiple, pero esta vez sin modificación. De igual forma, los electrodos de trabajo se probaron en las mismas condiciones que los anteriores, una VC en el rango entre de -0.3 V a 0.8 V (vs. Ag/AgCl) en buffer Tris-HCl de pH 8.8, con una velocidad de barrido a 0.01 V s^{-1} . En la Figura 14 se muestran las VCs del electrodo de trabajo UOx/MWCNT, la Figura 14-A es sin adiciones de ácido úrico y la Figura 14-B es con una concentración 700 μM de ácido úrico. El cambio de corriente que se presentó en el pico de oxidación fue de 2.08 μA (0.17 V). La VC se realizó a esta concentración de AU debido a que la mezcla depositada se desprendía del papel Toray después de pasar algunos segundos en la cronoamperometría en agitación. Al ser menor concentración del ácido, es por ello que no se observó una mayor curva catalítica, como con MWCNT-COOH, no obstante, se comprobó el correcto funcionamiento del sitio activo de la enzima.

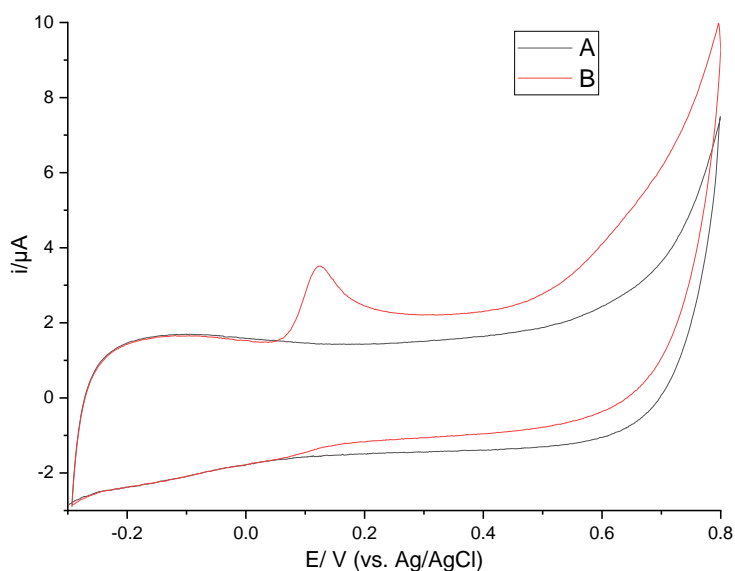


Figura 14 (A) VC sin adiciones de ácido úrico. (B) VC con una concentración de ácido úrico 600 μM . Ambas en buffer Tris-HCl (pH 8.8).

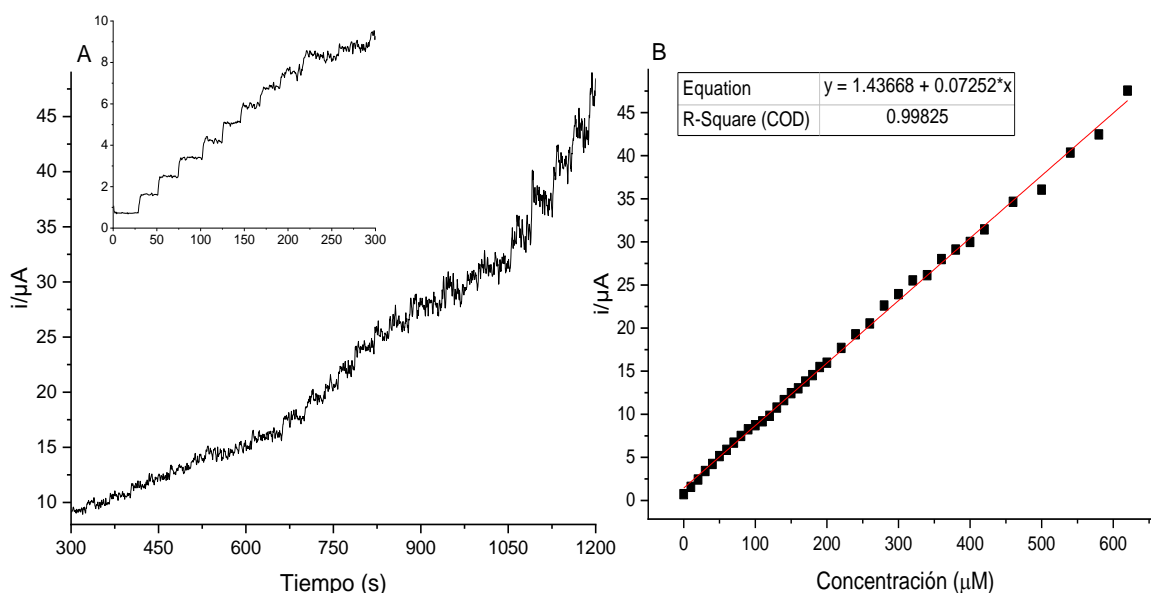


Figura 15 (A) Respuesta amperométrica del electrodo de trabajo UOx/MWCT con adiciones de ácido úrico, desde una concentración de 0 μM hasta 600 μM . (B) Curva de calibración del electrodo de trabajo UOx/MWCNT, mostrando corriente obtenida a diferentes concentraciones (pH 8.8).

En la Figura 15-A se muestra la cronoamperometría con un voltaje de trabajo de 0.3 V y con adiciones sucesivas de ácido úrico de 10 μM . Se observó una respuesta rápida y clara en las primeras adiciones tardando 4 segundos en estabilizarse. Pasando de una concentración de 200 μM , la señal comenzó a tener mayor presencia de ruido y un tiempo de estabilización mayor a 7 segundos, no obstante, la corriente seguía en aumento en cada adición de AU.

En la figura 15-B se observa la curva de calibración del electrodo de trabajo UOx/MWCNT, al igual que con la primera nanopartícula, se muestra la respuesta lineal de las primeras adiciones mostrando en la gráfica interior, obteniendo una R^2 igual a 0.99, con un rango lineal de 0 a 620 μM . Límite de detección igual a 3.89 μM , sensibilidad de 0.07 A M^{-1} y límite de cuantificación de 12.96 μM . El valor de K_m

igual a $9.60 \mu\text{M}$, lo cual indica una buena afinidad del sustrato y la enzima, pero menor que con MWCNT-COOH.

A pesar de obtener resultados satisfactorios debido a las altas corrientes obtenidas, la reproducibilidad de estos electrodos fue baja, esto debido a que, durante las cronoamperometrías, no se obtenían corrientes constantes en las adiciones y finalmente el depósito se desprendía del papel Toray en medio de la prueba. Como se puede observar, estos nanotubos fueron más inestables, obteniendo un menor rango lineal en comparación a MWCNT-COOH y menor respuesta de corriente con respecto a la concentración de ácido úrico, descartando esta opción.

7.1.3 Inmovilización de UOx con CNF

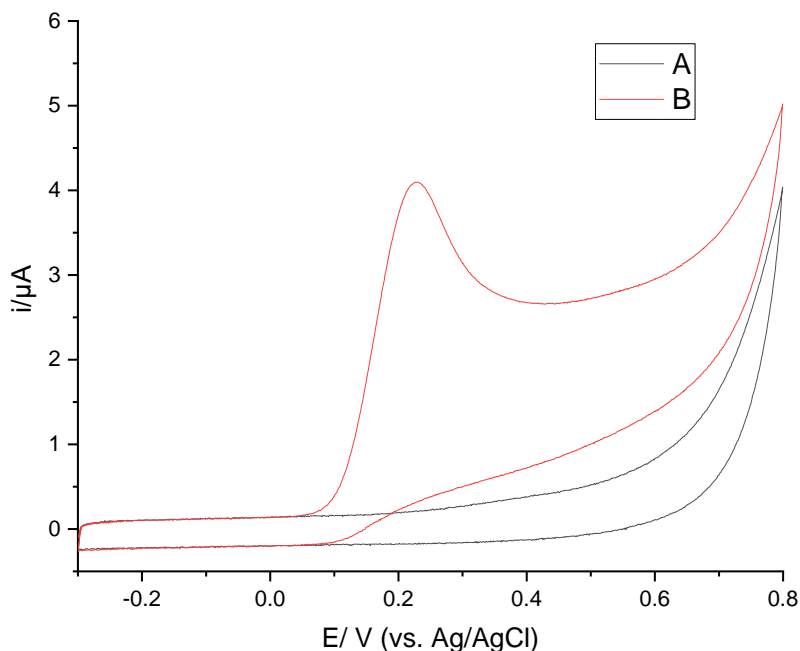


Figura 16 (A) VC sin adiciones de ácido úrico. (B) VC con una concentración de ácido úrico $1600 \mu\text{M}$. Ambas en buffer Tris-HCl (pH 8.8.).

Otra nanopartícula de carbón que se evaluó fueron CNF, siguiendo la misma metodología que las anteriores. Los electrodos de trabajo se probaron en las siguientes condiciones con respecto las anteriores. En la Figura 16 se muestran las VCs del electrodo de trabajo UOx/CNF, en la Figura 16-A, se muestra la VC sin

adiciones de ácido úrico y la Figura 16-B se muestra la VC con una concentración 1600 μM de ácido úrico.

El cambio de corriente que se observó en la Figura 16-B entre el blanco y la VC con ácido úrico fue de 3.92 μA (0.23 V). Si bien el rango obtenido de la VC fue hasta una concentración de 1600 μM , se observó que el valor de corriente obtenido en la curva catalítica fue menor con respecto a los nanotubos carboxilados.

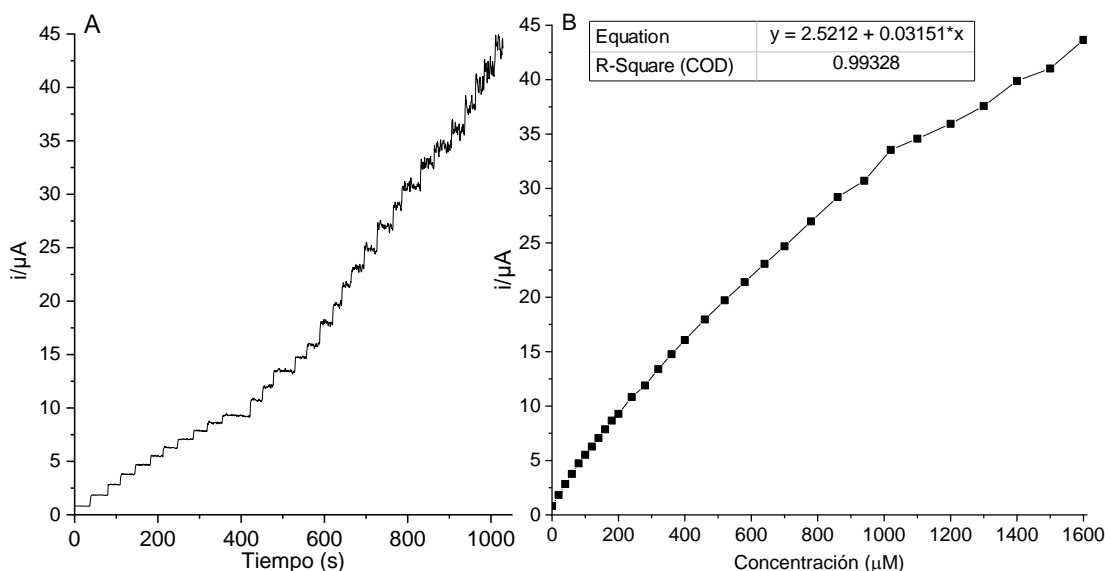


Figura 17: (A) Respuesta amperométrica del electrodo de trabajo UOx/MWCNT-COOH con adiciones de ácido úrico, desde una concentración de 0 μM hasta 1500 μM . (B) Curva de calibración del electrodo de trabajo UOx/MWCNT-COOH, mostrando corriente obtenida a diferentes concentraciones (pH 8.8).

En la Figura 17-A se muestra una cronoamperometría en 0.3 V (vs. Ag/AgCl) con adiciones sucesivas de ácido úrico. Se observó una respuesta clara hasta una concentración de 1600 μM , sin embargo, el cambio de corriente en cada adición se pudo apreciar sin mayores problemas, tomando un tiempo de estabilización de 3 a 4 segundos en cada escalón. Entre mayor era la concentración, el tiempo de estabilización incrementaba.

En la Figura 17-B se muestra la curva de calibración del electrodo de trabajo UOx/CNF, donde se obtuvo una R^2 igual a 0.98, este valor se sigue considerando



con excelente linealidad. Límite de detección igual a $1.02 \mu\text{M}$, sensibilidad de 0.02 A M^{-1} , límite de cuantificación de $3.41 \mu\text{M}$ y una K_m de $9.68 \mu\text{M}$. Para esta nanopartícula, la reproducibilidad fue muy buena, se obtuvo el triplicado sin mayores complicaciones, no hubo desprendimiento de la pasa del papel Toray y los valores arrojados en las diferentes pruebas fueron muy regulares. Es por ello que se seleccionó las nanofibras de carbón para continuar con el desarrollo del proyecto.

7.1.4 Comparativas nanopartículas

Una vez obtenidos los resultados de las nanopartículas, se compararon para observar su comportamiento y determinar la más viable para el proyecto. Desde un inicio con los nanotubos carboxilados y nanotubos simples, la reproducibilidad representó una gran problemática, esto debido a que la pasta depositada en el papel Toray se desprendía por completo, arrojando valores erróneos en la corriente.

En la Tabla 3, se muestran valores de interés que se consideraron para la elección de la nanopartícula de trabajo. En primer lugar, se muestra el límite de detección, el cual indica la mínima concentración que puede ser detectada por el electrodo de trabajo. La nanopartícula que mostró mejor resultado fue CNF. Para el límite de cuantificación, de igual forma, CNF obtuvo el mejor resultado respecto a las otras nanopartículas.

Tabla 3 Comparativa Nanopartículas

Electrodo	LD (μM)	LQ (μM)	Sensibilidad (A/M)	Km (μM)	Rango lineal (μM)
UOx/MWCNT-COOH	3.86	12.89	0.12	1.26	0 – 1650
UOx/MWCNT	1.43	12.96	0.07	9.59	0 – 620
UOx/CNF	1.02	3.40	0.02	9.68	0 – 1600

Otro factor muy importante para realizar la selección, fue el valor de la constante de Michaelis Menten (K_m), la cual entre menor sea su valor, indica que existe una mayor afinidad entre la enzima y el sustrato. Como se observa en la Tabla 1, los valores

entre CNF y MWCNT son muy similares, pero para MWCNT-COOH tiene el valor más bajo, lo que se observa en la Figura 18, al ser la nanopartícula con la que se obtuvo mayor corriente en comparación a las otras dos.

Por último, se muestra el rango lineal, las 3 nanopartículas tuvieron un valor de R^2 de 0.99. Sin embargo, para MWCNT, el rango lineal fue menor debido a la inestabilidad de la pasta depositada. Para realizar la elección de la nanopartícula de trabajo, se tomó en consideración los valores analizados y principalmente la reproducibilidad.

La primera nanopartícula que se descartó fueron los MWCNT-COOH, esto debido a la baja reproducibilidad que se mostró en la Figura 13-C. La pasta depositada en el papel Toray se desprendía con gran facilidad y los resultados obtenidos fueron muy irregulares. En la Figura 18, podemos observar la comparación de las curvas de calibración de las diferentes nanopartículas.

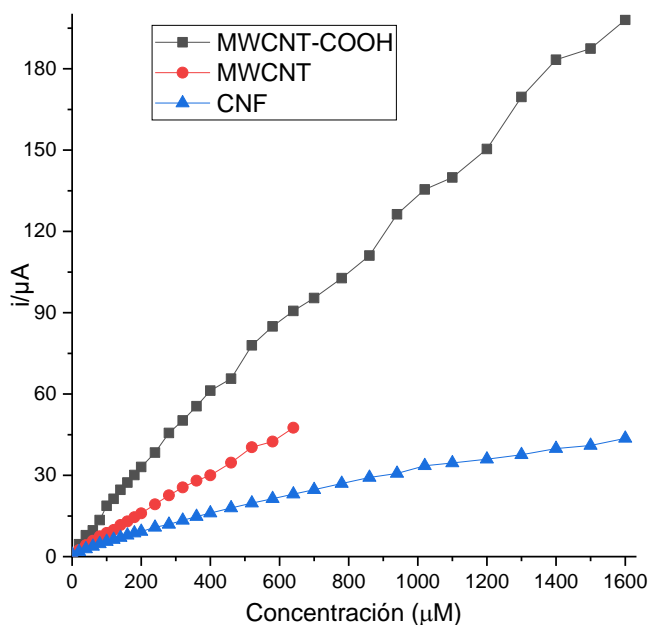


Figura 18: Comparativa de curvas de calibración de las nanopartículas evaluadas a pH 8.84.



La nanopartícula que se seleccionó para seguir con el desarrollo del proyecto fue CNF, a causa del valor de límite de detección, límite de cuantificación y el rango lineal, siendo esta nanopartícula con la que se obtuvieron resultados con mayor regularidad, en un rango lineal amplio y con un buen límite de detección, debido a las propiedades que presenta esta nanopartícula [35][36].

7.2 Relaciones estequiométricas

Después de que se realizó la selección de la nanopartícula, siendo las CNF, se prosiguió con la optimización de las diferentes variables que se incluyen para el desarrollo del electrodo de trabajo. Los valores iniciales fueron los siguientes: 10 mg mL⁻¹ de UOx, 10 mg mL⁻¹ de CNF y pH 8.8.

En primer lugar, se optimizó la concentración de la enzima UOx. Se consideraron las siguientes concentraciones para la optimización: 1 mg mL⁻¹, 5 mg mL⁻¹, 10 mg mL⁻¹ y 20 mg mL⁻¹. La concentración del resto de los reactivos se mantuvo con los valores iniciales, para observar el comportamiento de la enzima UOx.

Posteriormente, una vez optimizada la concentración de enzima, se llevó a cabo la optimización de CNF, considerado las siguientes concentraciones: 1 mg mL⁻¹, 5 mg mL⁻¹, 10 mg mL⁻¹ y 20 mg mL⁻¹. De igual forma que en la optimización de la enzima, los otros reactivos se mantuvieron en las concentraciones establecidas.

Para cada una de las diferentes concentraciones, se realizaron VC en un rango entre de -0.3 V a 0.8 V (vs. Ag/AgCl) en buffer Tris-HCl de pH 8.8, con una velocidad de muestreo a 0.01 V s⁻¹. También se realizaron cronoamperometrías en agitación, agregando alícuotas de AU para observar el comportamiento del electrodo de trabajo.

7.2.1 UOx 1 mg mL⁻¹

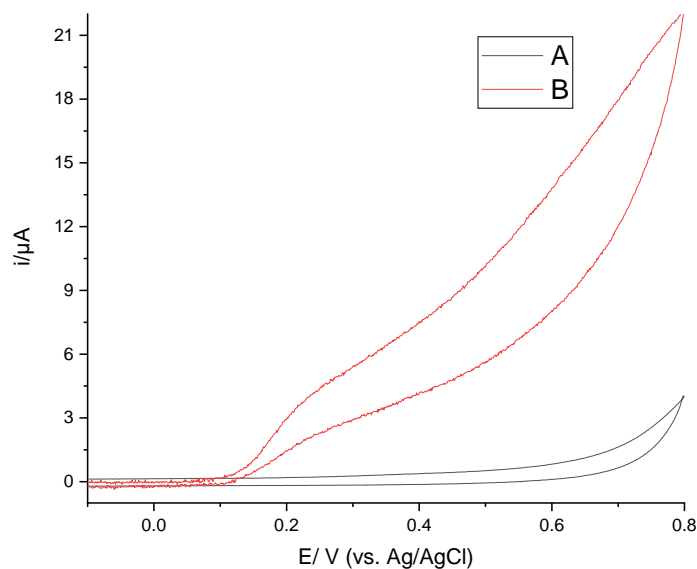


Figura 19 (A) VC sin adiciones de ácido úrico. (B) VC con una concentración de ácido úrico 1600 μM. Ambas en buffer Tris-HCl (pH 8.8.)

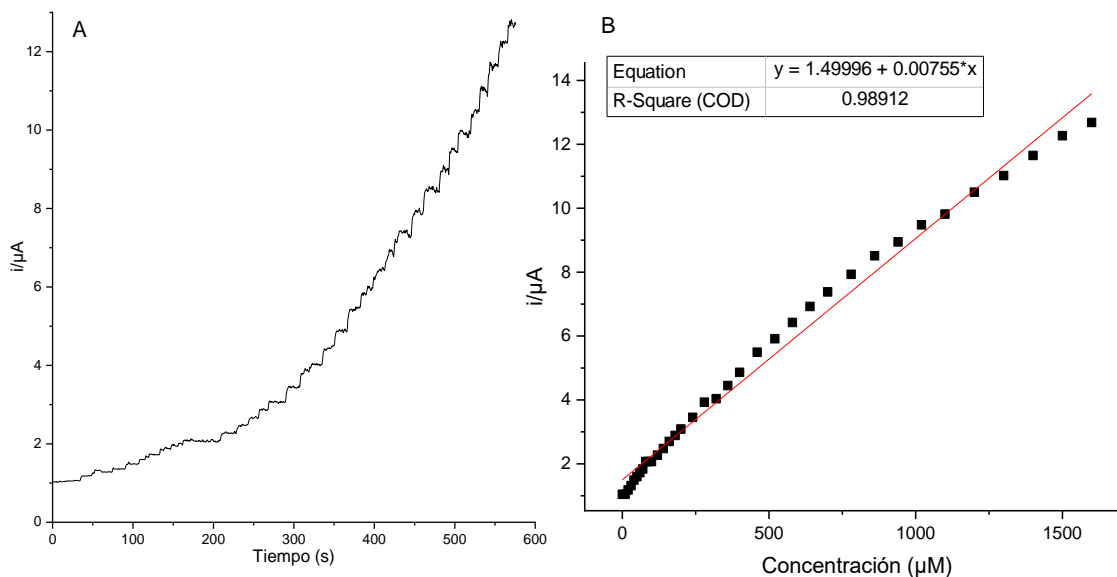


Figura 20 (A) Respuesta amperométrica del electrodo de trabajo (1 mg mL⁻¹ de UOx) con adiciones de ácido úrico, desde una concentración de 0 μM hasta 1600 μM. (B) Curva de calibración del electrodo de trabajo (1 mg mL⁻¹ de UOx), mostrando corriente obtenida a diferentes concentraciones.



En la Figura 19 se muestran las VCs con y sin adición de ácido úrico, donde la VC con ácido úrico no muestra una clara curva catalítica, como se observó en anteriores resultados. Esto debido a que al mantener poca enzima inmovilizada, la generación de peróxido es menor y por lo tanto no se genere por completo el pico de oxidación del peróxido.

En la Figura 20-A, se corroboró lo que se observó en la VC del mismo electrodo. A pesar de tener una respuesta al agregar alícuotas de AU, los cambios en la corriente fueron de menor magnitud, obteniendo una corriente máxima de 12.89 μA .

En la Figura 20-B, se obtuvo una curva de calibración con una R^2 de 0.98, indicando una alta linealidad. Se obtuvo un límite de detección de 99.33 μM y límite de cuantificación de 331.12 μM , indicando que se deberían obtener cambios de concentración superiores a los 99.33 μM para poder observar cambios en la corriente. Finalmente, la K_m fue de 88.30, resultando en muy poca afinidad del sustrato a la enzima y, en comparación a los resultados obtenidos, los datos arrojados por este electrodo fueron deficientes.

Por otra parte, se presentaron dificultades al realizar la experimentación, esto debido a la pequeña cantidad que se necesitaba pesar de la enzima, provocando que poca la enzima se lograra disolver por completo y manteniéndose adherida en las paredes del tubo Eppendorf. Se obtuvo el triplicado sin mayor problema, pero la variación estándar fue alta, lo que explica que el límite de detección y límite de cuantificación tenga valores tan elevados.

7.2.2 UOx 5 mg mL⁻¹

La segunda concentración que se evaluó fue con 5 mg de UOx por cada mililitro de solución. En la Figura 21, se apreció la curva catalítica característica a una concentración de 1600 μM de AU y el diferencial de corriente fue igual a 16.47 μA (0.22 V). Se muestra una mejor respuesta a diferencia de la concentración 1 mg mL⁻¹ de UOx.

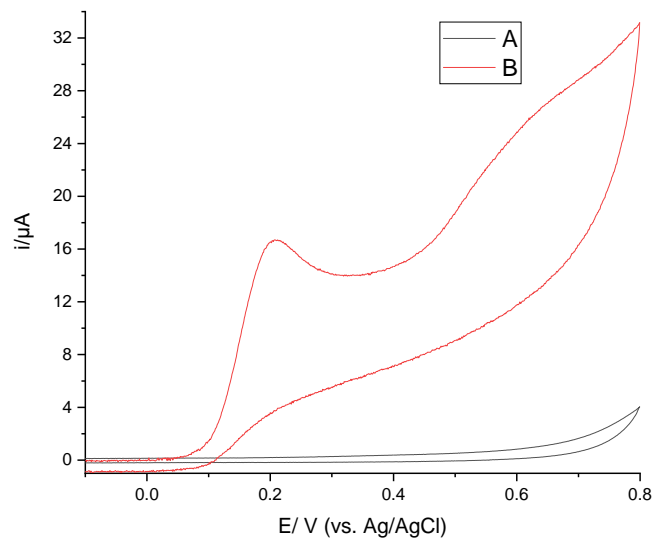


Figura 21 (A) VC sin adiciones de ácido úrico. (B) VC con una concentración de ácido úrico 1600 μM . Ambas en buffer Tris-HCl (pH 8.8) en 5 mg mL^{-1} de UOx.

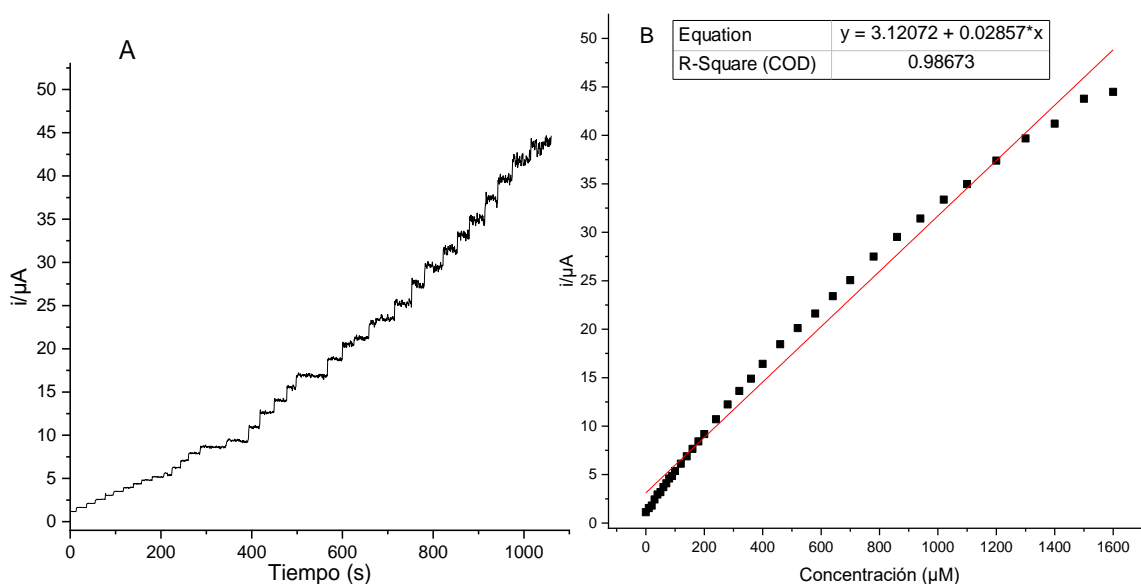


Figura 22 (A) Respuesta amperométrica del electrodo de trabajo (5 mg mL^{-1} de UOx) con adiciones de ácido úrico, desde una concentración de 0 μM hasta 1600 μM . (B) Curva de calibración del electrodo de trabajo (5 mg mL^{-1} de UOx), mostrando corriente obtenida a diferentes concentraciones.

Con esta concentración fue más sencillo realizar la experimentación, la enzima no se quedaba adherida a las paredes del tubo Eppendorf y permitía una disolución correcta en la mezcla. También se vio reflejado en la desviación estándar, que tuvo un valor de 0.05.

7.2.3 UOx 10 mg mL⁻¹

Esta concentración de 10 mg de UOx por cada mililitro fue establecida desde un inicio para realizar las pruebas con las diferentes nanopartículas, basándonos en artículos que seguían una metodología cross-linking [32][34]. En la Figura 23 se muestra 2 VCs, una sin AU y otra con una concentración de 1600 μ M de AU. Se observó la curva catalítica característica en el voltaje 0.30, obteniendo un diferencial de corriente de 12.22 μ A (0.26).

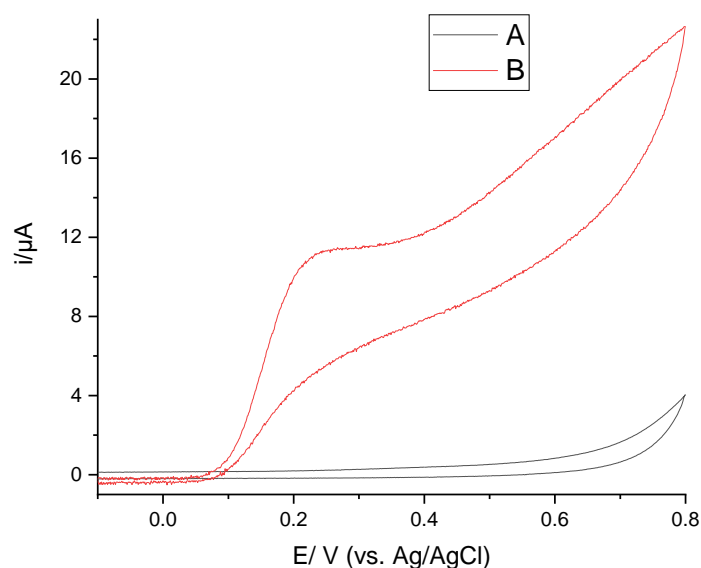


Figura 23 (A) VC sin adiciones de ácido úrico. (B) VC con una concentración de ácido úrico 1600 μ M. Ambas en buffer Tris-HCl (pH 8.8.) en 10 mg mL⁻¹ de UOx.

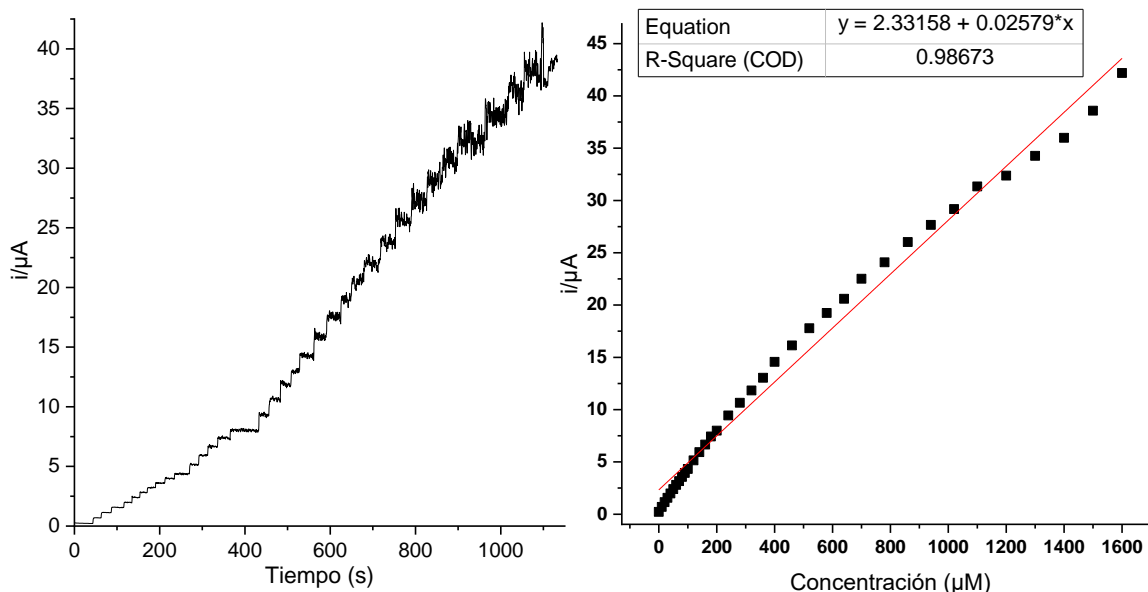


Figura 24 Respuesta amperométrica del electrodo de trabajo (10 mg mL^{-1} de UOx) con adiciones de ácido úrico, desde una concentración de $0 \text{ } \mu\text{M}$ hasta $1600 \text{ } \mu\text{M}$. (B) Curva de calibración del electrodo de trabajo (10 mg mL^{-1} de UOx), mostrando corriente obtenida a diferentes concentraciones.

En la Figura 24, se muestra la cronoamperometría del electrodo de trabajo con su respectiva curva de calibración, donde se obtuvo una R^2 de 0.98, límite de detección igual a $1.11 \text{ } \mu\text{M}$, un límite de cuantificación de $3.70 \text{ } \mu\text{M}$ y un valor de K_m igual a $9.68 \text{ } \mu\text{M}$, indicando una excelente afinidad del sustrato y de la enzima en esta concentración.

Los escalones se muestran con gran definición y el ruido se presenta superando la concentración de $700 \text{ } \mu\text{M}$. El límite de detección indica que se podrán observar los cambios superiores a $1.11 \text{ } \mu\text{M}$, lo que nos permite tener un electrodo de trabajo con mayor exactitud.

7.2.4 UOx 20 mg mL^{-1}

Como última variante respecto a la concentración de la enzima, se realizó con 20 mg de enzima por mililitro de solución. La experimentación no presentó dificultades,

sin embargo, al verter la enzima en la solución, se apreció que no se disolvía por completo, quedando mínimos residuos de UOx.

En la Figura 25 se muestran VC sin y con AU, donde el diferencial de corriente fue de 12.26 μA (0.21 V), valor similar que con una concentración de enzima de 10 mg por mililitro. Esto se debe a dos factores importantes, el primero es en la disolución de la enzima, donde al notar que quedan residuos, los 20 mg no se inmovilizan en el electrodo del trabajo. El segundo factor es que, al haber enzima en exceso en la mezcla, se comenzó a encimar entre sí misma, inmovilizándose de forma incorrecta y afectando directamente en la reacción catalítica.

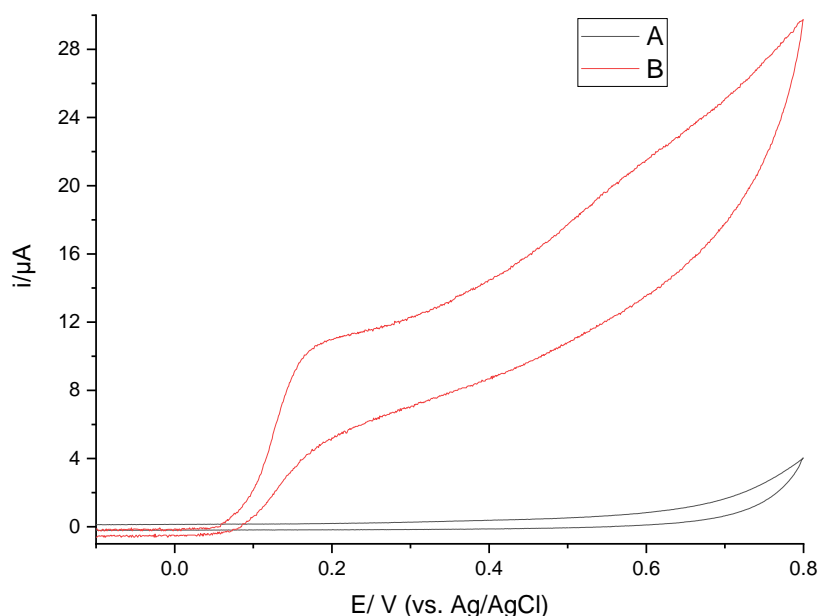


Figura 25 (A) VC sin adiciones de ácido úrico. (B) VC con una concentración de ácido úrico 1600 μM . Ambas en buffer Tris-HCl (pH 8.8.) en 20 mg mL^{-1} de UOx.

En la Figura 26, se muestra la cronoamperometría y su curva de calibración, donde se obtuvo una R^2 de 0.97, límite de detección de 1.17 μM , límite de cuantificación de 3.92 μM y una K_m de 13.48 μM . Se observó poco ruido pasando la concentración de 800 μM de AU. A pesar de ser buenos resultados para el desarrollo del biosensor, se esperaba un mayor aumento en la corriente al agregar alícuotas de AU, esto

debido por tener mayor enzima, sin embargo, fueron valores similares a la concentración de 10 mg mL^{-1} de UOx.

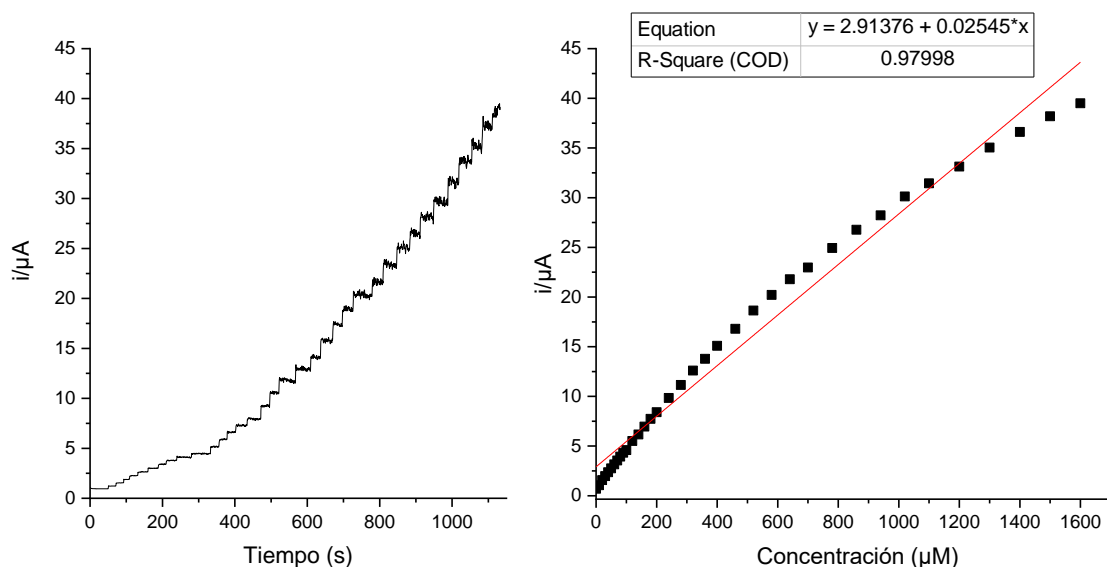


Figura 26 (A) Respuesta amperométrica del electrodo de trabajo (20 mg mL^{-1} de UOX) con adiciones de ácido úrico, desde una concentración de $0 \mu\text{M}$ hasta $1600 \mu\text{M}$. (B) Curva de calibración del electrodo de trabajo (20 mg mL^{-1} de UOX), mostrando corriente obtenida a diferentes concentraciones.

7.2.5 Comparativas concentraciones UOx

Una vez obtenido los resultados de las diferentes concentraciones de enzima, se compararon los valores de interés obtenidos como el límite de detección y la K_m , sin dejar de lado la parte experimental. Los datos se colocaron en la Tabla 4, donde se muestran los valores de interés, con los cuales se eligió la concentración ideal.

En primer lugar, se probó con 1 mg mL^{-1} de UOx, el cual presentó problemas tanto en resultados como en experimentación, donde se obtuvo corrientes muy bajas y poca afinidad entre sustrato y enzima. Una desviación estándar alta, lo cual afectó de forma directa tanto el límite de detección y límite de cuantificación, es por ello que se descartó esta concentración

Tabla 4 Comparativa diferentes concentraciones de UOx

Concentración UOx	LD (μM)	LQ (μM)	Sensibilidad (A/M)	K_m (μM)	Rango lineal (μM)
1 mg mL⁻¹	99.33	331.12	0.01	88.30	0 – 1600
5 mg mL⁻¹	5.77	19.25	0.02	11.21	0 – 1600
10 mg mL⁻¹	1.11	3.70	0.02	9.68	0 – 1600
20 mg mL⁻¹	2.26	7.56	0.02	16.70	0 – 1600

La siguiente concentración que se descartó fue 20 mg mL⁻¹ de UOx, donde en la experimentación, se observaba poca disolución de la enzima en la mezcla. El factor principal que se consideró, fue la efectividad de la concentración, donde al agregar más enzima, se esperaba obtener mayor corriente. Sin embargo, al comparar las curvas de calibración que se muestran en la Figura 27, se observa la similitud en cuanto a los valores de la corriente en las diferentes concentraciones de AU.

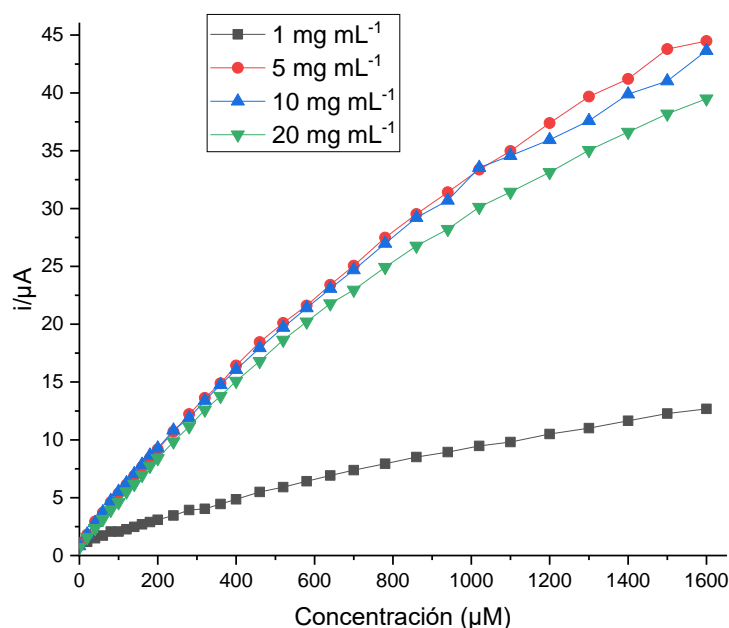


Figura 27 Comparativa de curvas de calibración de las diferentes concentraciones de UOX, evaluadas a pH 8.84.

En la Figura 27, se observan las curvas de calibración de las diferentes concentraciones de UOx, mostrando la corriente obtenida con la concentración de AU, llegando hasta una concentración final de 1600 μM . Finalmente, la concentración que se seleccionó con base a los resultados obtenidos de las curvas de calibración, el valor de K_m , límite de detección, límite de cuantificación y la manipulación en la parte experimental fue la concentración de 10 mg mL^{-1} de UOx. Donde el valor de K_m fue de 9.68 μM , el más bajo de todas las concentraciones, también para el límite de detección y cuantificación.

7.2.6 CNF 1 mg L^{-1}

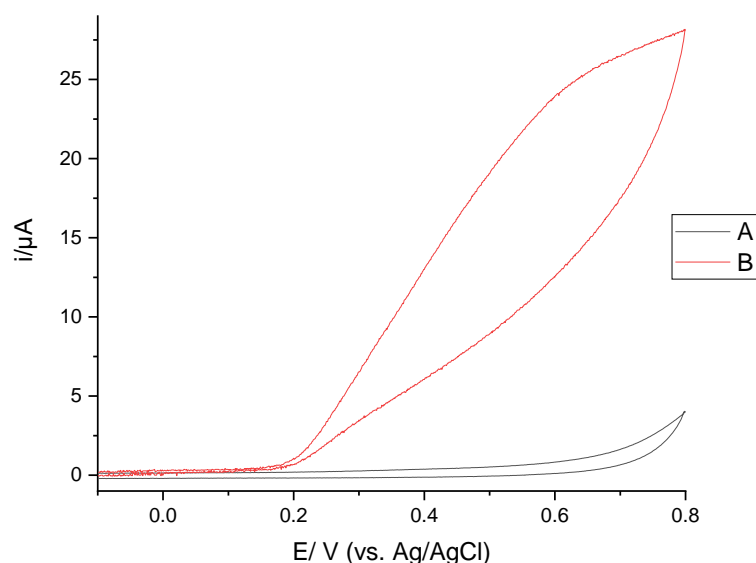


Figura 28 (A) VC sin adiciones de ácido úrico. (B) VC con una concentración de ácido úrico 1600 μM . Ambas en buffer Tris-HCl (pH 8.8.) en 1 mg mL^{-1} de CNF.

Una vez optimizada la concentración de enzima, se procedió a probar con diferentes concentraciones de CNF, comenzando con 1 mg de CNF por mililitro de solución. En la Figura 28, se observa la VC sin ácido úrico y la VC con una concentración de 1600 μM , donde el electrodo de trabajo responde al AU, sin embargo, no se observó

la curva característica como en resultados anteriores, esto debido a la baja conducción que se logró con esta concentración de CNF.

En la Figura 29, se muestra la cronoamperometría durante 750 segundos, en esta gráfica se observa poco ruido y la obtención de poca corriente por la baja cantidad de H_2O_2 generada. En la curva de calibración, se obtuvo una R^2 de 0.99, límite de detección de $14.80 \mu\text{M}$, límite de cuantificación de $49.35 \mu\text{M}$ y una K_m de $63.29 \mu\text{M}$. Si bien se obtuvo una linealidad excelente en el rango de 0 a $1600 \mu\text{M}$ de AU, el resultado de la K_m fue ligeramente elevado en comparación a los resultados obtenidos, demostrando poca afinidad entre el sustrato y la enzima. En cuanto a la experimentación, fue sencillo dispersar las CNF, incluso en menor tiempo del predeterminado, 15 minutos.

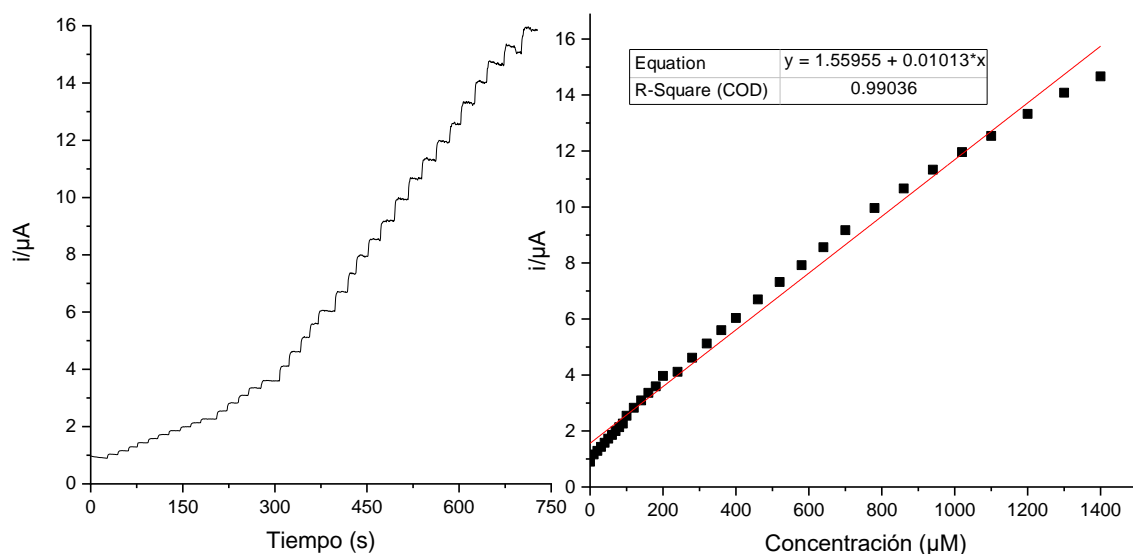


Figura 29 (A) Respuesta amperométrica del electrodo de trabajo (1 mg mL^{-1} de CNF) con adiciones de ácido úrico, desde una concentración de $0 \mu\text{M}$ hasta $1600 \mu\text{M}$. (B) Curva de calibración del electrodo de trabajo (1 mg mL^{-1} de CNF), mostrando corriente obtenida a diferentes concentraciones.

7.2.7 CNF 5 mg L⁻¹

Posteriormente se siguió con la concentración de 5 mg de CNF por mililitro de solución. En la Figura 30 se muestra la VC sin AU y la VC con AU en una concentración de 1600 μM , resultando un diferencial de corriente de 16.2 μA en la curva catalítica, en el voltaje de barrido de 0.3.

En la Figura 31, se muestra la cronoamperometría del electrodo de trabajo, teniendo una buena respuesta hasta una concentración de AU de 700 μM , posterior a esta concentración, la señal se mostró con ruido y un tanto inestable. De igual forma, se muestra la curva de calibración del electrodo de trabajo, obteniendo una R^2 de 0.97, en un rango de 0 a 1600 μM . También se obtuvo un valor de K_m de 12.63 μM , límite de detección igual a 0.92 μM y límite de cuantificación de 3.05 μM .

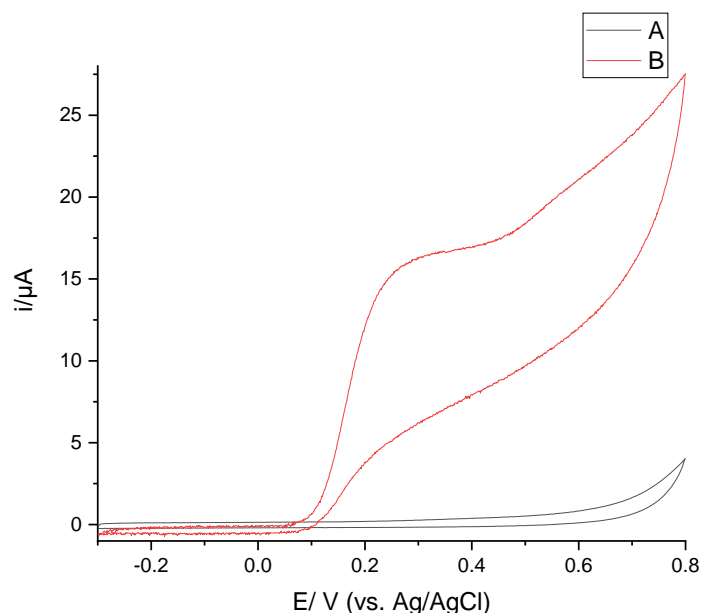


Figura 30 (A) VC sin adiciones de ácido úrico. (B) VC con una concentración de ácido úrico 1600 μM . Ambas en buffer Tris-HCl (pH 8.8.) en 5 mg mL⁻¹ de CNF.

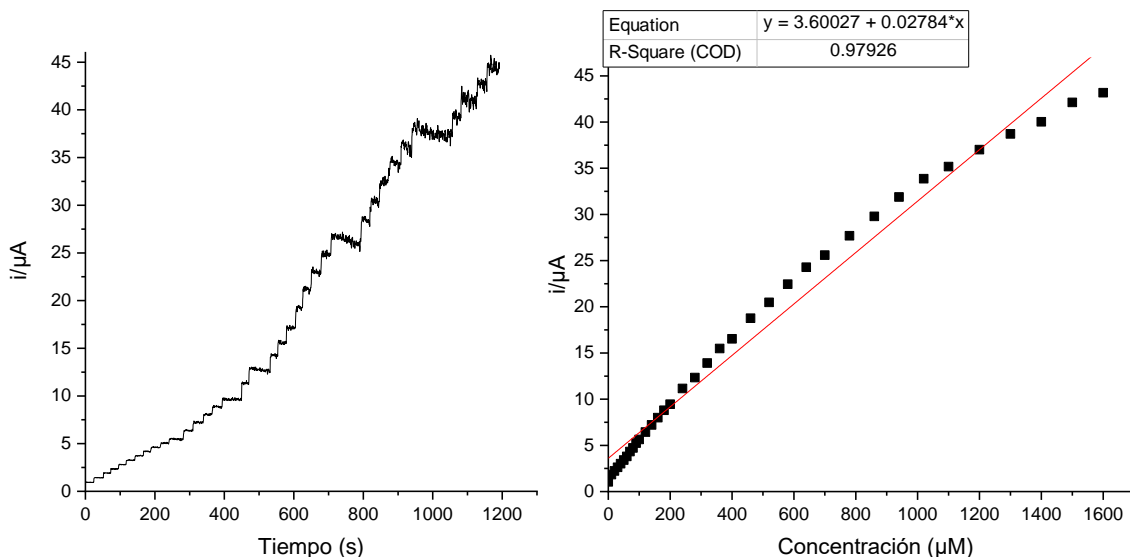


Figura 31 (A) Respuesta amperométrica del electrodo de trabajo (5 mg mL^{-1} de CNF) con adiciones de ácido úrico, desde una concentración de $0 \mu\text{M}$ hasta $1600 \mu\text{M}$. (B) Curva de calibración del electrodo de trabajo (5 mg mL^{-1} de CNF), mostrando corriente obtenida a diferentes concentraciones.

Como se puede observar, el límite de detección que se obtuvo fue muy bajo, permitiendo captar con mayor facilidad los cambios de concentración de AU. Los niveles de corriente fueron mucho mejores, en comparación a la concentración pasada de CNF. Al sonicar la solución final, igual se podía apreciar que se necesitaba menos minutos para lograr una buena dispersión de las CNF. Finalmente, en esta concentración, se obtuvieron los mejores resultados para lograr la optimización del electrodo de trabajo.

7.2.8 CNF 10 mg L^{-1}

En la Figura 32 se muestra la VC sin AU y la VC con AU, obteniendo una concentración final de $1600 \mu\text{M}$. Se obtuvo un diferencial de corriente igual a $11.34 \mu\text{A}$ en un voltaje de barrido de 0.3 V . El resultado del diferencial de corriente no aumentó al tener mayor cantidad de CNF, considerando este primer valor como malo, en comparación al diferencial de corriente con una concentración de 5 mg L^{-1} de CNF.

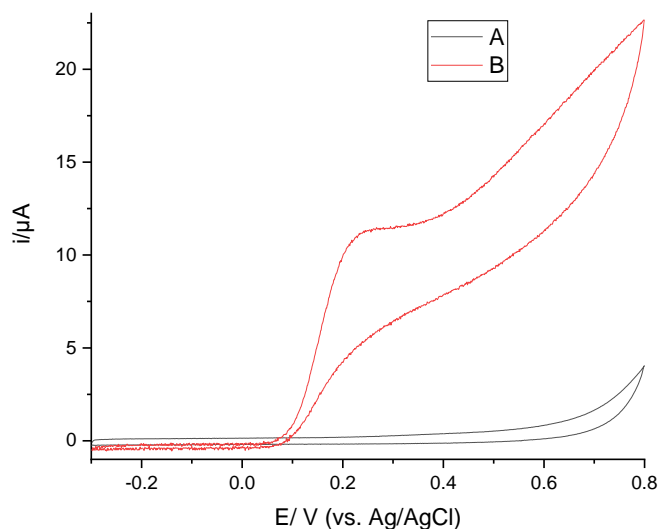


Figura 32 (A) VC sin adiciones de ácido úrico. (B) VC con una concentración de ácido úrico 1600 μM . Ambas en buffer Tris-HCl (pH 8.8.) en 10 mg mL^{-1} de CNF.

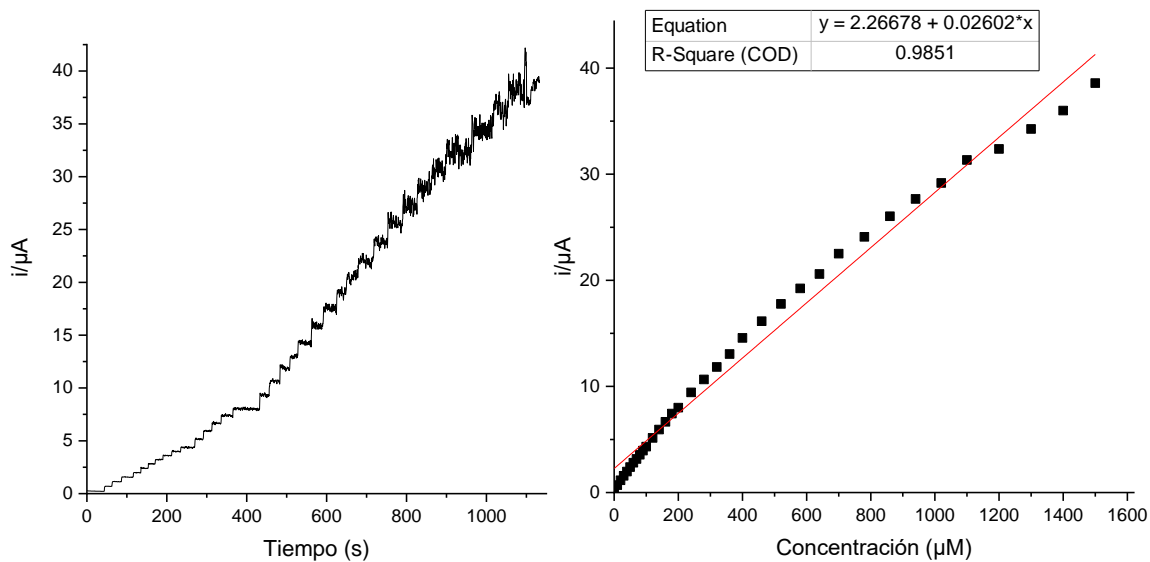


Figura 33 (A) Respuesta amperométrica del electrodo de trabajo (10 mg mL^{-1} de CNF) con adiciones de ácido úrico, desde una concentración de 0 μM hasta 1600 μM . (B) Curva de calibración del electrodo de trabajo (10 mg mL^{-1} de CNF), mostrando corriente obtenida a diferentes concentraciones.

En la Figura 33, se muestra la cronoamperometría del electrodo de trabajo, mostrando poco ruido después de la concentración de 600 μM de AU. También se muestra la curva de calibración, se obtuvo una R^2 de 0.98, límite de detección de 1.04 μM , límite de cuantificación de 3.49 μM y una K_m de 21.27 μM , siendo un valor de K_m alto en comparación a resultados anteriores. En el rango de 0 a 1600 μM se obtuvo una excelente linealidad.

7.2.9 CNF 20 mg L⁻¹

Finalmente se realizó el electrodo de trabajo con una concentración de 20 mg de CNF por mililitro de solución. En la Figura 34, se muestra la VC sin AU y la VC con una concentración de AU de 1600 μM , sin embargo, el pico de oxidación se recorrió ligeramente hacia la izquierda, presentando la curva catalítica en un voltaje de barrido de 0.16 V, obteniendo un diferencial de corriente de 52.94 μA .

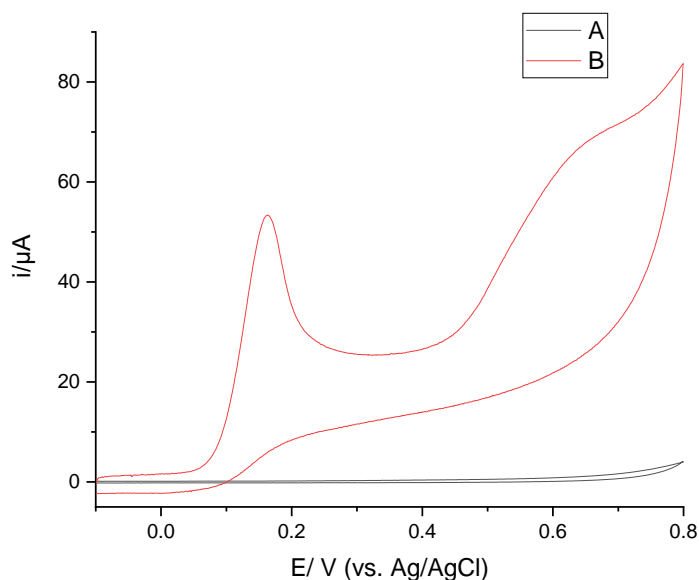


Figura 34 (A) VC sin adiciones de ácido úrico. (B) VC con una concentración de ácido úrico 1600 μM . Ambas en buffer Tris-HCl (pH 8.8.) en 20 mg mL⁻¹ de CNF.

En la Figura 35, se muestra la cronoamperometría, donde se obtuvieron valores de corrientes muy altos, llegando a una corriente de 94.56 μA en una concentración de

1600 μM . También se muestra la curva de calibración, obteniendo una R^2 de 0.98, límite de detección de 13.25 μM , límite de cuantificación de 44.18 μM y una K_m de 2.32 μM .

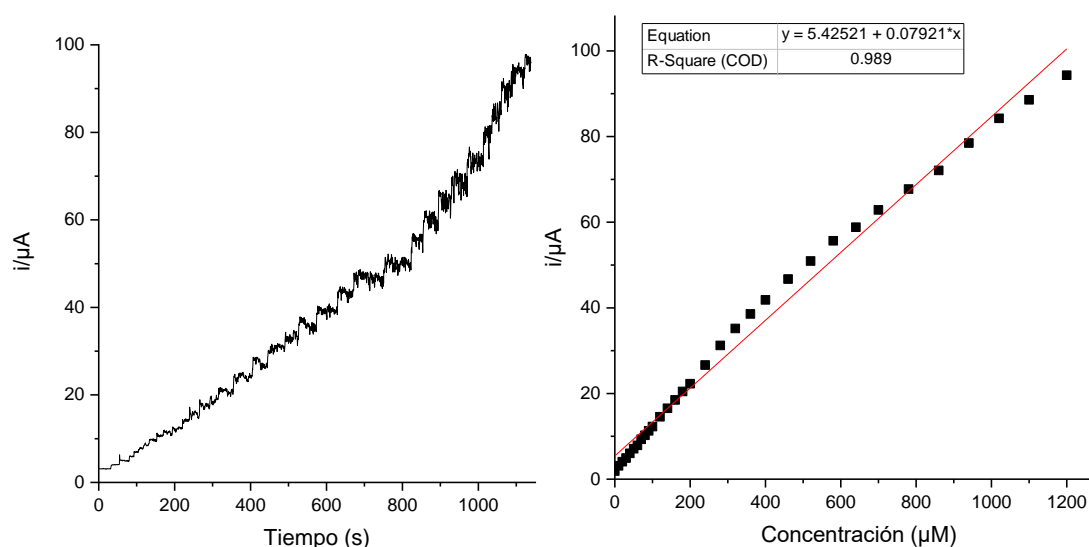


Figura 35 (A) Respuesta amperométrica del electrodo de trabajo (20 mg mL^{-1} de CNF) con adiciones de ácido úrico, desde una concentración de $0 \mu\text{M}$ hasta $1600 \mu\text{M}$. (B) Curva de calibración del electrodo de trabajo (20 mg mL^{-1} de CNF), mostrando corriente obtenida a diferentes concentraciones.

Si bien se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a una respuesta amperométrica, el problema principal que se presentó al usar esta concentración fue la reproducibilidad, En la Figura 35, la curva de calibración que se muestra, es un promedio de 4 electrodos evaluados, llegando a alcanzar corrientes superiores a los 120 μA . En cuanto a la experimentación, al verter las CNF en la solución, esta se convertía en una pasta, que al sonicar, no se dispersaban en lo absoluto.

Se colocó la pasta en el papel Toray con un pincel, perdiendo por completo la medida de los 15 μL que se debía agregar, como se mencionó en la experimentación. Dando como resultados, corrientes muy variadas entre los diferentes electrodos evaluados.

7.2.10 Comparativas concentraciones CNF

Una vez obtenidos los resultados de las diferentes concentraciones de CNF evaluadas, se llegó a la concentración óptima para el desarrollo del biosensor. En primer lugar, la concentración que se descartó fue 1 mg mL^{-1} , debido a las bajas corrientes obtenidas y el valor tan alto de la K_m . Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5 Comparativa diferentes concentraciones de CNF

Concentración CNF	LD (μM)	LQ (μM)	Sensibilidad (A/M)	K_m (μM)	Rango lineal (μM)
1 mg mL^{-1}	14.81	49.36	0.01	63.30	0 – 1600
5 mg mL^{-1}	0.92	3.05	0.03	12.64	0 – 1600
10 mg mL^{-1}	1.64	3.49	0.03	21.28	0 – 1600
20 mg mL^{-1}	13.25	44.18	0.07	2.32	0 – 1600

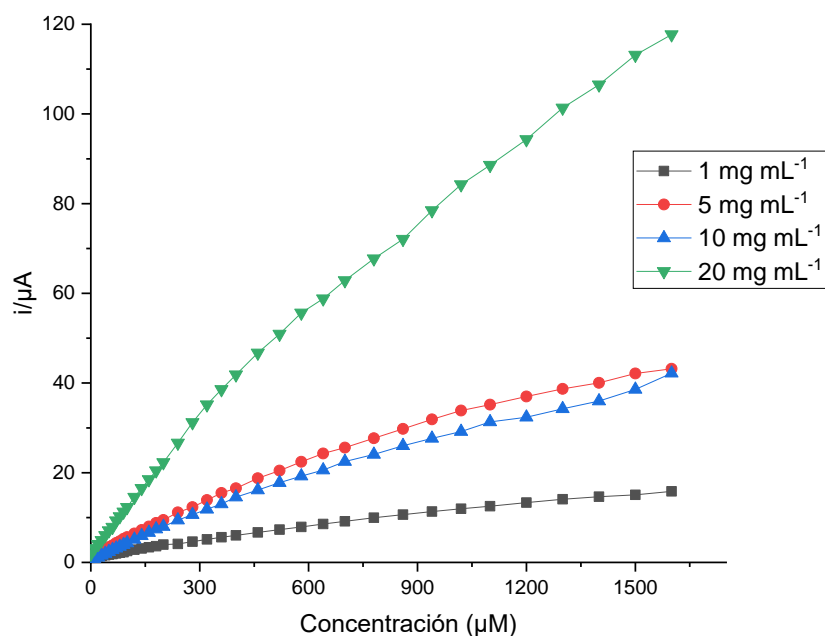


Figura 36 Comparativa de curvas de calibración de las diferentes concentraciones de CNF, evaluadas a pH 8.84.



Posteriormente, se descartó la concentración de 20 mg mL^{-1} , esto a causa de la baja reproducibilidad que se obtuvo, tanto VCs como amperometrías arrojaban resultados completamente distintos durante las evaluaciones, provocando en algunos electrodos baja linealidad o un valor alto en la K_m .

Finalmente, se decantó por la concentración de 5 mg mL^{-1} , esto debido a los resultados similares que se obtuvieron respecto a la concentración de 10 mg mL^{-1} , Se obtuvo un valor más bajo en la K_m y en la parte experimental, las CNF se dispersaban con mayor facilidad y en menor tiempo.

En la Figura 36, se muestran curvas de calibración de las diferentes concentraciones de CNF, colocando en la concentración de 20 mg mL^{-1} el mejor resultado de los electrodos que se evaluaron. Se observa los resultados similares entre la concentración de 5 y 10 mg mL^{-1} , sin embargo, se obtuvo ligeramente mayor corriente con la concentración de 5 mg mL^{-1} , eligiendo esta última como la concentración óptima para el desarrollo del biosensor.

7.3 Evaluación a diferente pH

Una vez optimizadas las concentraciones de enzima UOx y de la nanopartícula CNF, se siguió con la evaluación de los electrodos de trabajo en diferentes valores de pH, donde se observó el comportamiento del electrodo de trabajo. Se evaluaron en 2 tipos de buffer, en los siguientes valores: buffer de fosfato pH 7.4, buffer de fosfato pH 5.7 y buffer de acetato pH 4.5. Como se mencionó anteriormente, estos valores de pH se encuentran en fluidos biológicos, como sangre, saliva, sudor, por lo que se observó el comportamiento del biosensor en dichos valores.

Para cada una de los diferentes valores de pH, se realizaron VC en un rango entre de -0.3 V a 0.8 V (vs. Ag/AgCl), con una velocidad de muestreo a 0.01 V s^{-1} . También se realizaron cronoamperometrías en agitación, agregando alícuotas de AU para observar el comportamiento del electrodo de trabajo.

7.3.1 pH 7.4

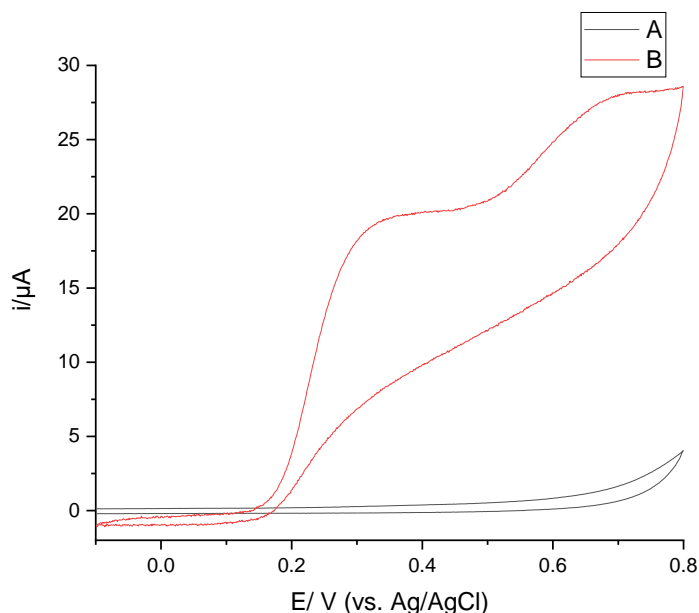


Figura 37 (A) VC sin adiciones de ácido úrico. (B) VC con una concentración de ácido úrico 1600 μM . Ambas en buffer de fosfato (pH 7.4).

En la Figura 37, se muestra la VC sin AU y la VC con una concentración de 1600 de AU, observando la curva catalítica con un ligero corrimiento a la izquierda, en un voltaje de barrido de 0.35 y un diferencial de corriente de 19.95 μA .

En la Figura 38, se muestra la cronoamperometría con adiciones de AU, observando poco ruido durante toda la prueba. También se muestra la curva de calibración, obteniendo una R^2 de 0.98, límite de detección de 1.05 μM , límite de cuantificación de 3.52 μM y una K_m de 14.37 μM , mostrando una buena afinidad entre enzima y sustrato. Este valor de pH 7.4 es el de mayor interés, debido a que la sangre se encuentra en este rango, siendo el principal fluido que se desea probar en el biosensor.

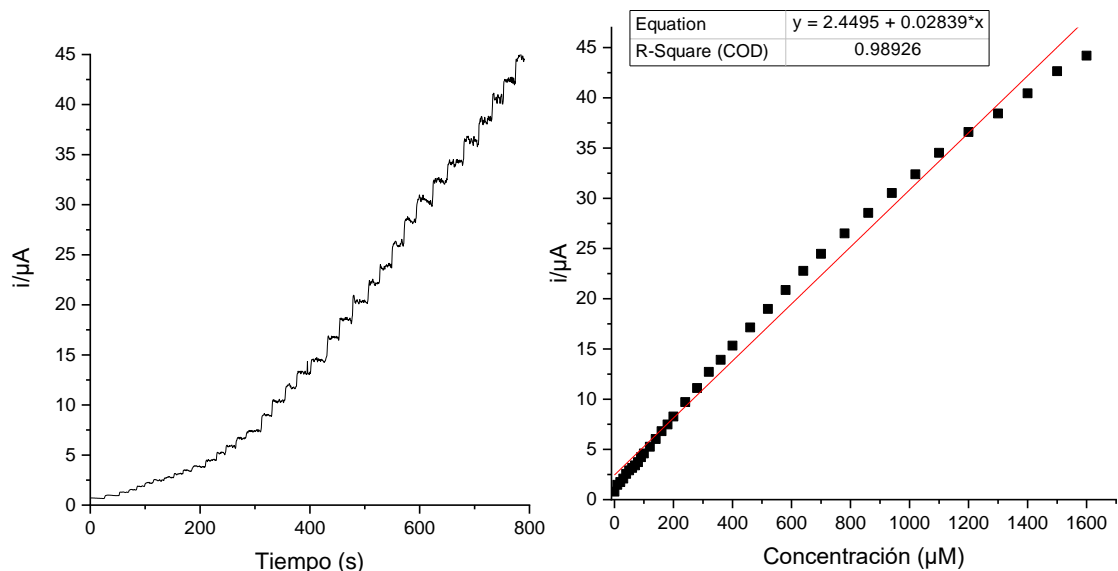


Figura 38 Respuesta amperométrica del electrodo de trabajo con adiciones de ácido úrico, desde una concentración de 0 μM hasta 1600 μM . (B) Curva de calibración del electrodo de trabajo, mostrando corriente obtenida a diferentes concentraciones.

7.3.2 pH 5.7

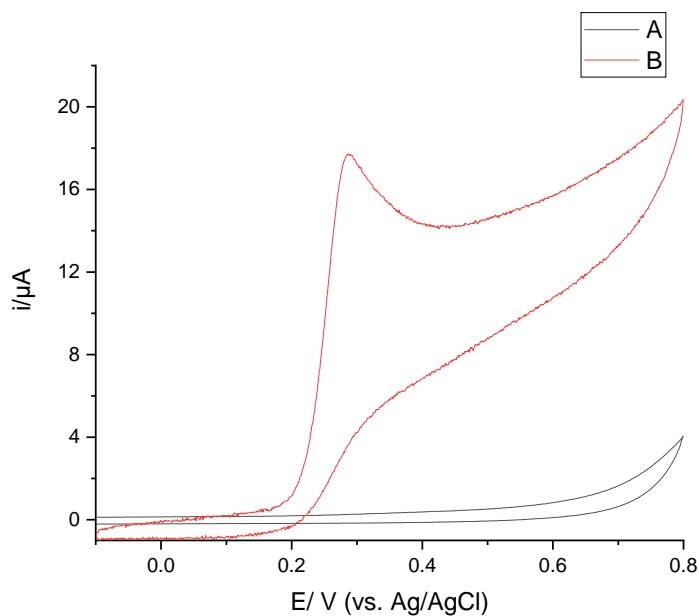


Figura 39 (A) VC sin adiciones de ácido úrico. (B) VC con una concentración de ácido úrico 1600 μM . Ambas en buffer de fosfato (pH 5.7).

Posteriormente, se evaluó el pH 5.7, esto a causa de que la saliva se encuentra en este rango. En la Figura 39, se muestra la VC sin AU y la VC con una concentración de 1600 de AU, obteniendo un diferencial de corriente de $14.32 \mu\text{A}$ y la curva catalítica en un voltaje de barrido de 0.27 V .

En la Figura 40, se observa la cronoamperometría con adiciones de AU. De igual forma, se muestra la curva de calibración, obteniendo una R^2 de 0.97, límite de detección de $5.16 \mu\text{M}$, límite de cuantificación $17.21 \mu\text{M}$ y una K_m de $11.39 \mu\text{M}$. Conforme el medio se vuelve ácido, la linealidad del electrodo baja, principalmente en concentraciones altas debido a la saturación de la enzima.

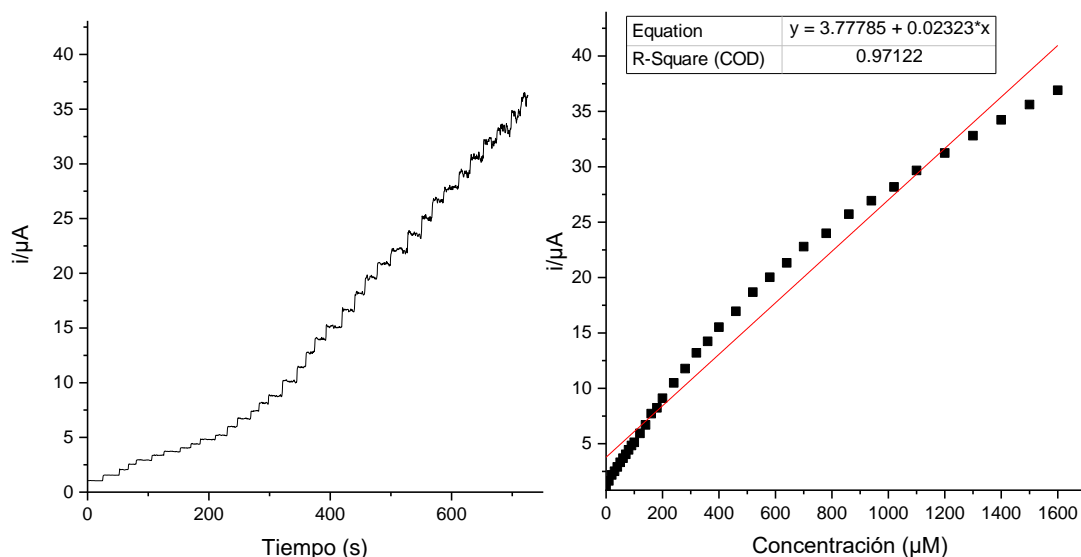


Figura 40 (A) Respuesta amperométrica del electrodo de trabajo con adiciones de ácido úrico, desde una concentración de $0 \mu\text{M}$ hasta $1600 \mu\text{M}$. (B) Curva de calibración del electrodo de trabajo, mostrando corriente obtenida a diferentes concentraciones.

7.3.3 pH 4.5

Por último, se realizó la prueba en pH 4.5, siendo de interés debido a que el sudor se encuentra en este rango, al igual que la saliva, las mediciones en muestras reales podrían ser de forma no invasiva. En la Figura 41, se muestra la VC sin AU y la VC

con una concentración de AU de 1600 μM , observando la curva catalítica a un voltaje de barrido de 0.34 V.

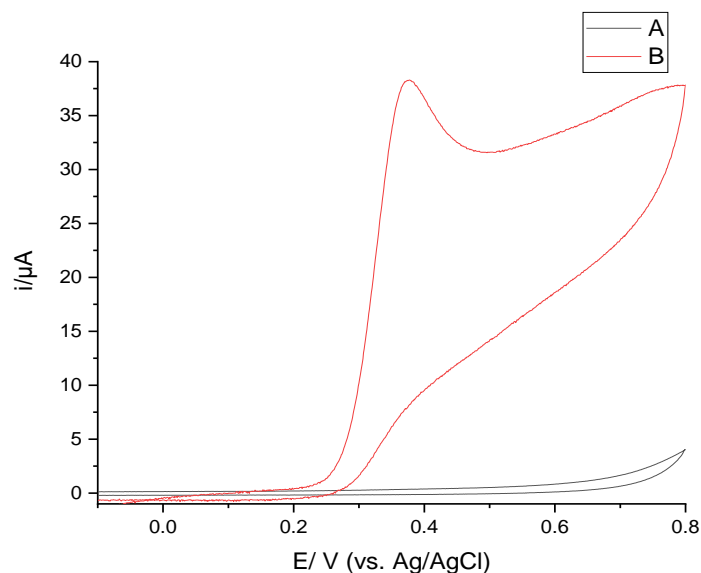


Figura 41 (A) VC sin adiciones de ácido úrico. (B) VC con una concentración de ácido úrico 1600 μM . Ambas en buffer de acetato (pH 4.5).

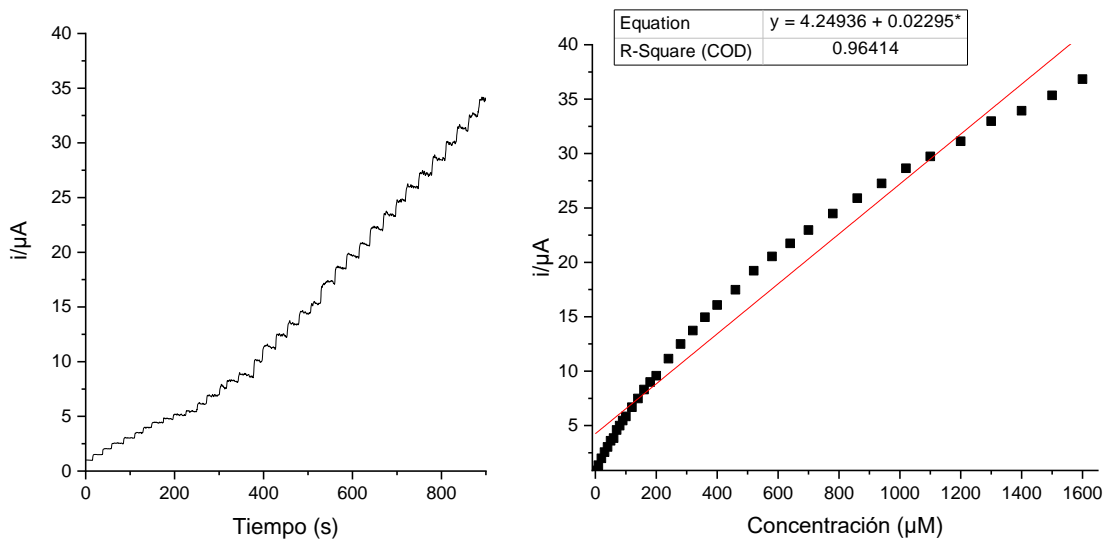


Figura 42 (A) Respuesta amperométrica del electrodo de trabajo con adiciones de ácido úrico, desde una concentración de 0 μM hasta 1600 μM . (B) Curva de calibración del electrodo de trabajo, mostrando corriente obtenida a diferentes concentraciones.



En la Figura 42, se muestra la cronoamperometría del electrodo de trabajo en el medio ácido, se observa ligeramente escalones irregulares en las adiciones de AU, pero con poco ruido. De igual manera, se muestra la curva de calibración, donde se obtiene una R^2 de 0.96, límite de detección de $5.22 \mu\text{M}$, límite de cuantificación de $17.42 \mu\text{M}$ y una K_m de $10.25 \mu\text{M}$, obteniendo una buena afinidad entre la enzima y el sustrato en medio ácido.

7.3.4 Comparativas a diferentes valores de pH

Se evaluaron los electrodos de trabajo en los diferentes valores de pH para observar el comportamiento y si era apto para realizar pruebas con distintos fluidos biológicos. Las principales diferencias se observaron en la linealidad en las curvas de calibración, donde la linealidad se afectó al ser el medio más ácido, el cambio no fue en exceso, pero la enzima se comenzó a saturar a menores concentraciones, disminuyendo la linealidad.

En la tabla 6 se muestran los valores de interés, observando que son muy similares en las K_m , sin embargo, en el límite de detección y de cuantificación se vieron ligeramente diferenciados, entre los más ácidos y los básicos. Todas se mantuvieron en el rango de 0 a $1600 \mu\text{M}$.

Tabla 6 Comparativa de resultados a diferentes valores de pH

Valor pH	LD (μM)	LQ (μM)	Sensibilidad (A/M)	K_m (μM)	Rango lineal (μM)
8.8	0.91	3.05	0.03	12.63	0 – 1600
7.4	1.06	3.52	0.03	14.37	0 – 1600
5.7	2.58	8.60	0.02	11.39	0 – 1600
4.5	2.61	8.71	0.02	10.25	0 – 1600

Finalmente, en la Figura 43, se muestran las curvas de calibración de los diferentes valores de pH, donde se hace notorio como en medios ácidos, la enzima se satura más rápido, lo que provoca pérdida de linealidad en concentraciones superiores a

los 1000 μM de AU. Otro punto a resaltar es el corrimiento del pico de oxidación en las VCs, siendo que en medios ácidos tiende a recorrerse ligeramente a la izquierda, y en medios básicos a la derecha.

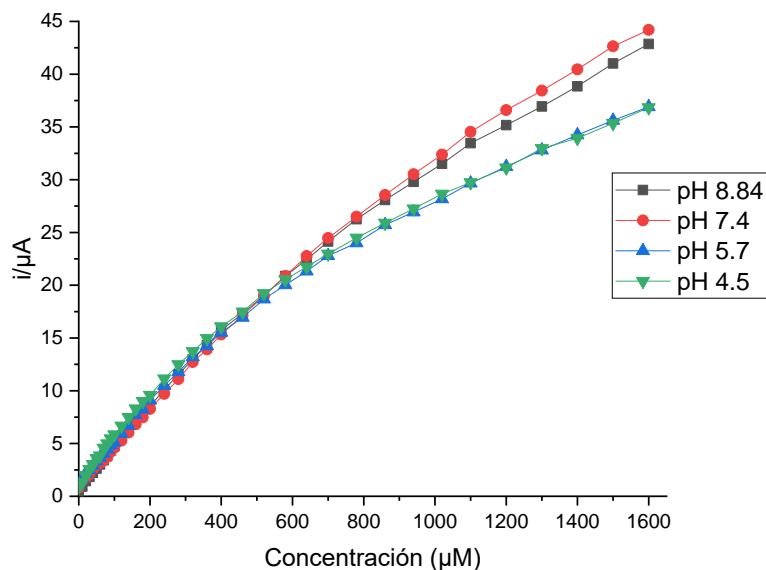


Figura 43 Comparativa de curvas de calibración de los electrodos de trabajo, evaluados a diferentes valores de pH.

7.3.5 Cronoamperometría estática

Posteriormente a las cronoamperometrías escalonadas, también se realizaron cronoamperometrías en estática, las cuales nos permiten simular una situación más cercana a la realidad, donde se agregan gotas de la muestra al biosensor en un estado estático, sin agitación para calcular la concentración de AU. La prueba estática se realizó cada que se hizo una adición de AU durante 300 s.

En la Figura 44, se muestran todas las cronoamperometrías que se realizaron en cada adición de AU, desde una concentración 0 μM , hasta llegar a una concentración de 5000 μM en un pH de 7.4.

Este tipo de prueba se realizó para observar el comportamiento del sistema conforme pasa el tiempo y en un estado estático, como se observa en la Figura 44, en los primeros segundos se obtienen corrientes altas, sin embargo, el valor de corriente real es cuando se llega a la estabilización, después de los 120 segundos.

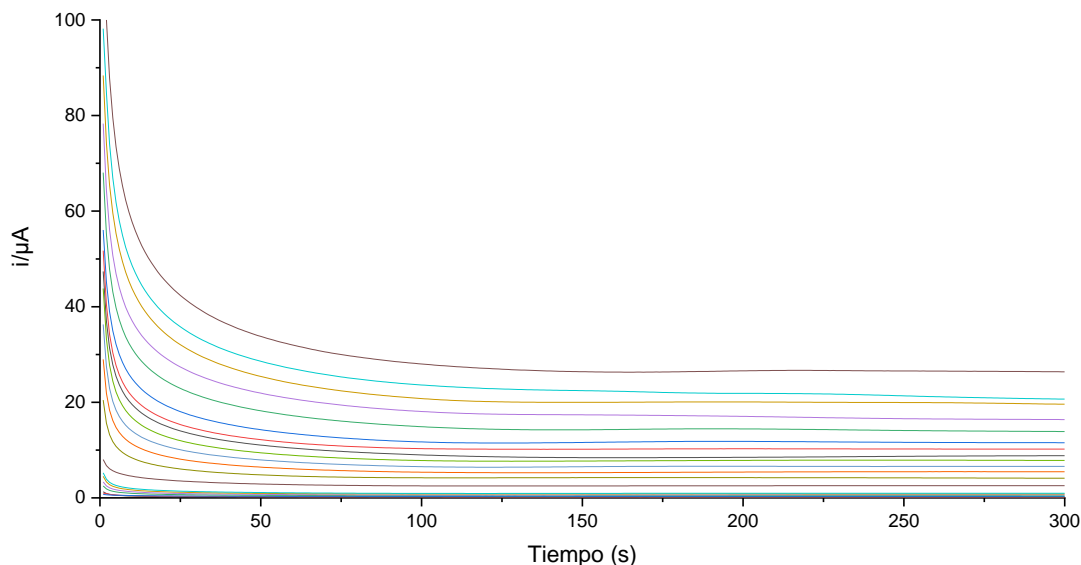


Figura 44 Cronoamperometrías en estática evaluadas a diferentes concentraciones de ácido úrico durante 300 s. Partiendo de una concentración de 0 μM , hasta 5000 μM , en PBS 7.4.

En la Figura 45, se muestran las curvas de calibración de las estáticas en diferentes tiempos, desde los 15 segundos, hasta los 300 segundos. Como se puede observar, a partir de los 120 segundos, se llega a la estabilización de la corriente, lo que indica que el sistema necesita 120 segundos después de agregar la muestra para obtener el resultado real de la prueba.

Se realizó la misma prueba en pH 5.7, considerando que el proyecto pudiera ser dirigido a sudor, sin embargo, los resultados no fueron satisfactorios, como se mencionó en resultados anteriores, en medios ácidos, la enzima llega más rápido a su saturación, causando que el rango lineal se mantenga de 0 a 1600 μM .

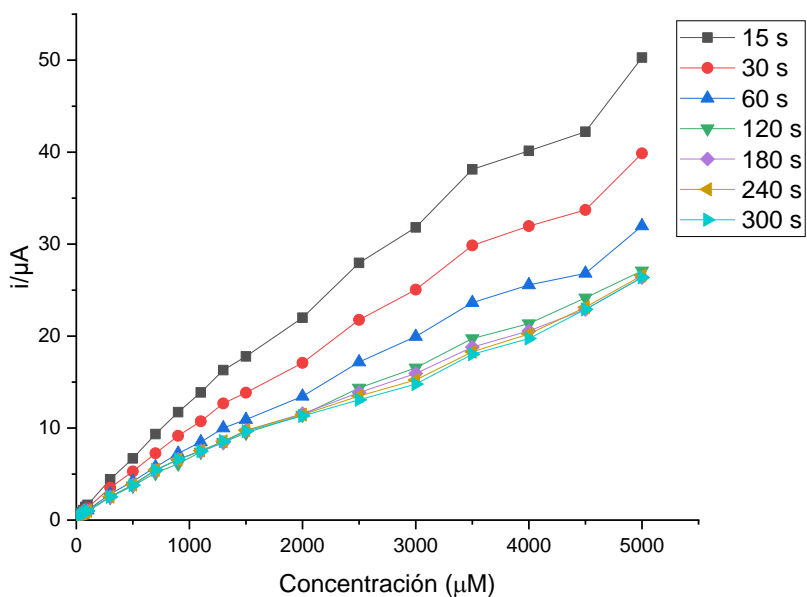


Figura 45 Comparativa de curvas de tiempo de las diferentes concentraciones de ácido úrico, evaluadas a pH 7.4.

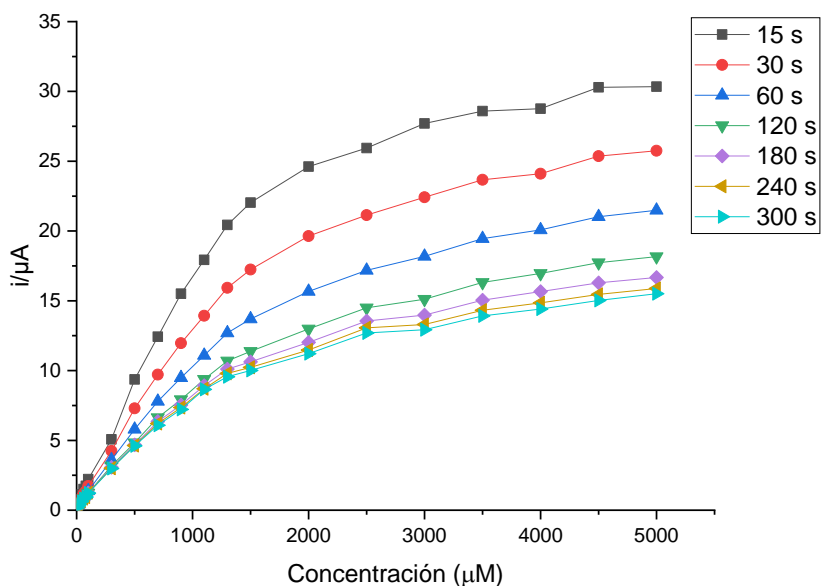


Figura 46 Comparativa de curvas de tiempo de las diferentes concentraciones de ácido úrico, evaluadas a pH 5.7.

Una vez que se sobrepasa este rango, los aumentos de corriente son menores, provocando que sea más complicada la detección de AU en concentraciones altas. Otro factor importante es el tiempo de estabilización, el cual se consiguió a partir de los 180 segundos, 60 segundos más que en la evaluación con pH 7.4.

7.4 Interferentes

Una vez que se observó el comportamiento del biosensor en pH 7.4, se siguió con la prueba de interferentes, donde se consideró sustancias que se encuentran en sangre y se observó el cambio de corriente al agregar cada una de estas. En la Figura 47, se muestra una cronoamperometría, en primer lugar, se agregó una alícuota de AU, con el cual se comprobó el correcto funcionamiento del sistema, posteriormente se agregaron los diferentes interferentes que se pueden encontrar en la sangre.

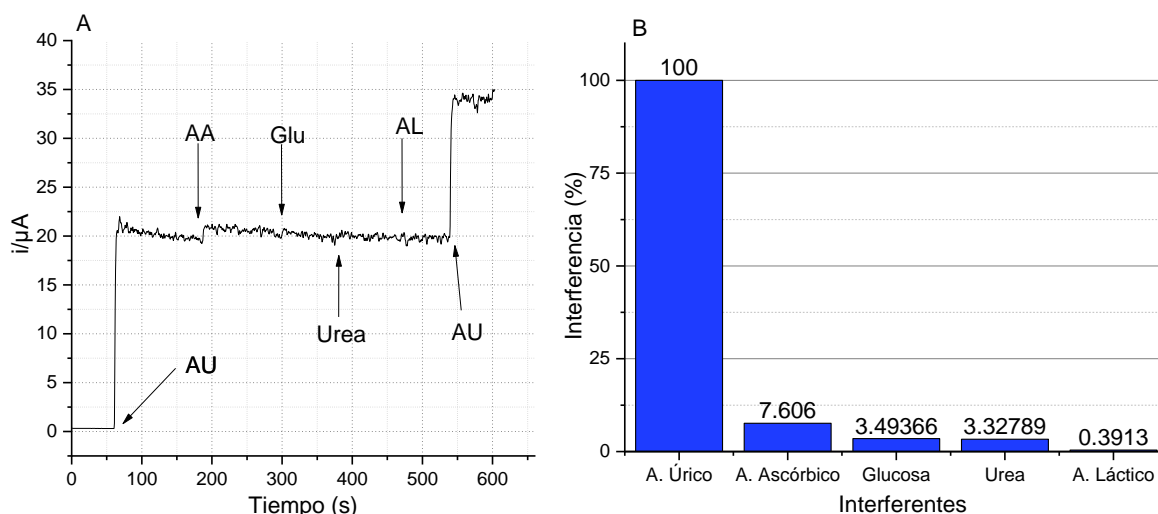


Figura 47 (A) Prueba de interferentes al electrodo de trabajo. Se agregó ácido úrico (AU), ácido ascórbico (AA), glucosa (Glu), urea y ácido láctico (AL). (B) Porcentaje de interferencia de cada sustancia.

En la Figura 47-B, se muestra el porcentaje de interferencia que tuvo cada sustancia en el sistema, siendo AU el 100 %. Cualquier sustancia que tenga una afectación mayor al 10% en el sistema, se considera como interferente potencial, el cual afectará de forma directa en la medición del AU. Sin embargo, el más cercano fue

el ácido ascórbico, con un porcentaje de afectación de 7.6 a una concentración de 60 μM . El resto de las sustancias interferentes que se consideraron, no presentaron un riesgo para el electrodo de trabajo.

7.4.1 Cronoamperometría estática en plano

Como última prueba, se realizó una cronoamperometría en estática, pero esta vez en un sistema en plano, el cual permitió usar muestras en menor cantidad, mientras en las estáticas convencionales se ocupó 5 mL de muestra para llevar a cabo la detección de AU, en este sistema en plano se necesitó de muestras con un volumen de 200 μL .

En la Figura 48, se muestran las curvas de calibración de los diferentes tiempos de las cronoamperometrías, desde una concentración 0 μM , hasta una concentración final de 2000 μM . Se observó la estabilización de la corriente pasando los 180 segundos.

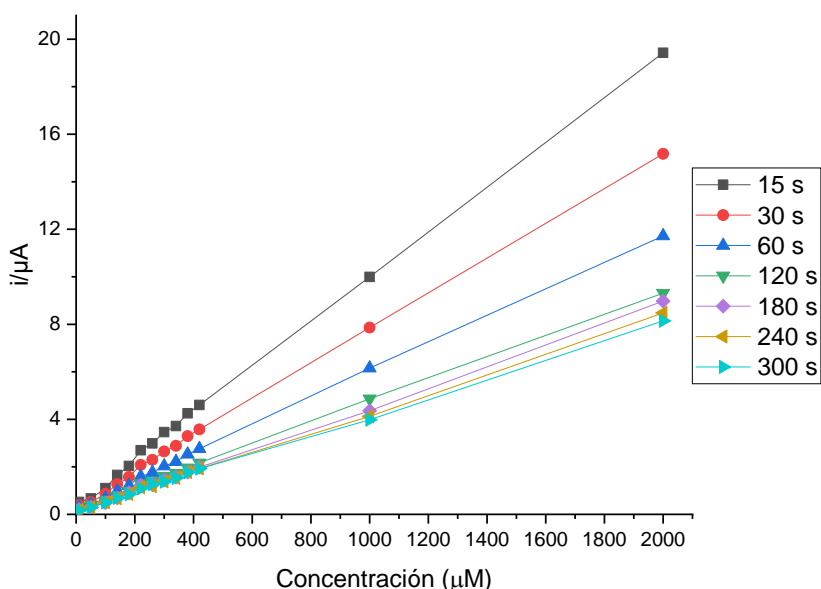


Figura 48 Comparativa de curvas de tiempo de las diferentes concentraciones de ácido úrico, evaluadas a pH 7.4, en sistema en plano.



En la tabla 7 se muestran las diferencias que se obtuvieron en los resultados con los diferentes sistemas que se evaluaron. En primer lugar, la cronoamperometría normal, donde se mantiene todo el tiempo en agitación y se agregan alícuotas de AU. En segundo lugar, la cronoamperometría en estática, donde se únicamente se agita el sistema al agregar alícuotas de AU y se realizan las cronoamperometrías en estática, sin agitación. Finalmente, la evaluación de las cronoamperometrías en estática en sistema en plano.

Tabla 7 Comparativa de diferentes resultados a pH 7.4

Eelctrodo	Potencial (V)	LD (μM)	LQ (μM)	Km (μM)	Rango lineal (μM)	Referencia
UOx/CNF Agitación	0.3	1.05	3.52	14.37	0 – 1600	Presente Trabajo
UOx/CNF Estática normal	0.3	2.26	7.54	243.83	0 – 5000	Presente Trabajo
UOx/CNF Estática en plano	0.3	3.91	13.04	1213.12	10 – 2000	Presente Trabajo
UOx/CZTS/ITO/glass	0.26	0.07	-	130	0 – 700	[37]
UOx/Au-rGO/ITO	0.22	7.32	-	51.74	50 – 800	[25]
Gold nanoparticles superstructure/UOx	0.6	7	-	1780	20 – 2500	[38]

Como se observó en los resultados de la tabla 7, si bien el sistema en plano es el ideal para llevar a cabo la detección de AU, el valor de la K_m es muy elevado, el cual se debe principalmente al electrodo de referencia que se utilizó y la efectividad que se pierde al disminuir las dimensiones del sistema. También se realizó una comparación con resultados reportados en diferentes artículos, los cuales mostraron una perspectiva del funcionamiento del biosensor, siendo este positivo al tener rangos similares, límites de detección y K_m por debajo de lo reportado. También se debe tomar en cuenta que los valores obtenidos de la K_m fueron elevados debido al electrodo de referencia.



7.5 Evaluación de biosensor en suero sanguíneo humano

Para cada muestra, se realizó VC en un rango entre de -0.3 V a 0.8 V (vs. Ag/AgCl), con una velocidad de muestreo a 0.01 V s^{-1} . También se realizaron cronoamperometrías en agitación para cada una y cronoamperometrías en estática, para observar la diferencia entre ambos resultados, siendo la misma concentración.

Las ecuaciones de las curvas de calibración que se usaron fueron las siguientes:

$$\text{Agitación: } y = 1.16197 + 0.03596x$$

$$\text{Estática: } y = 0.28484 + 0.00953x$$

7.5.1 Voluntario 1

Para observar un correcto funcionamiento del biosensor, se realizaron VCs sin suero y con adición de suero. Como se observa en la Figura 49, se obtuvo el pico de oxidación del peróxido, con un diferencial de corriente de $2.8 \mu\text{A}$ y a un voltaje de 0.35, ligeramente recorrida a la derecha, a comparación de los resultados obtenidos con adiciones de AU. La presencia de la curva catalítica en 0.3 V es característico a la oxidación de AU vía enzimática, lo que sugiere que el electrodo es activo en la presencia de AU en la muestra sanguínea sin la interferencia de moléculas que pudieran estar presentes.

Se realizó la evaluación en agitación, como se muestra en la Figura 50, donde primero se agregó 1 mL y posteriormente dos adiciones de 0.5 mL, obteniendo un volumen final de 4 mL. Al seguir este procedimiento, como se esperaba, se obtuvieron escalones de corriente, verificando el correcto funcionamiento del biosensor en diferentes concentraciones. El valor final de la corriente se tomó para obtener la concentración de AU en suero a través de la ecuación seleccionada. La concentración de AU en el suero del voluntario 1, calculado de acuerdo la curva de calibración al pH 7.4, fue de $192.30 \mu\text{M}$ que está dentro del rango normal de AU en suero humano.

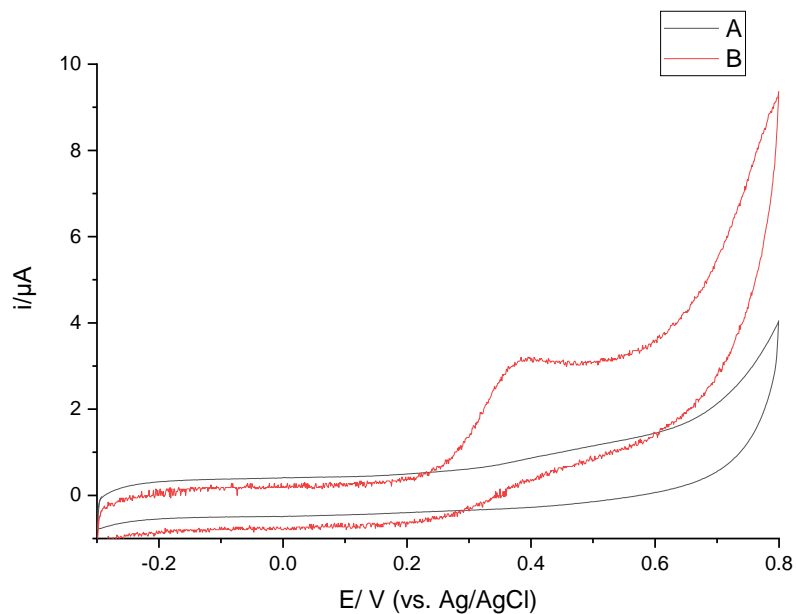


Figura 49 (A) VC sin adición de muestra. (B) VC con muestra real 2 mL de suero. Ambas con 2 mL de PBS a pH 7.4.

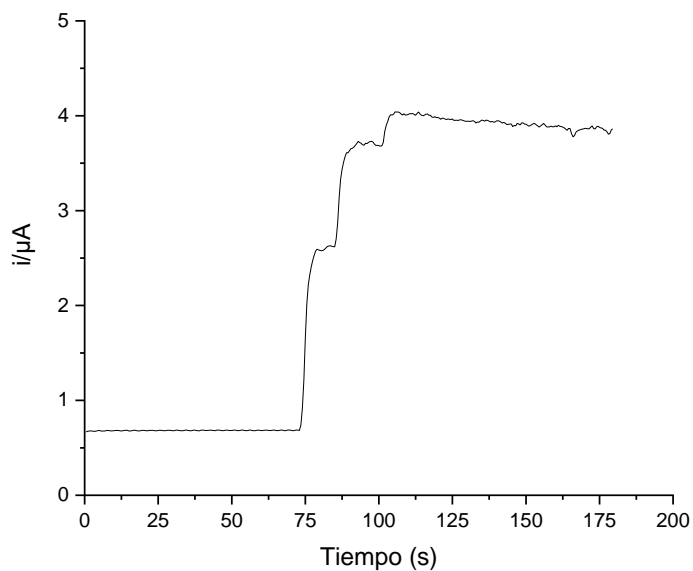


Figura 50 Cronoamperometría en agitación, 2 mL de PBS y adiciones de suero. Volumen final 4 mL.

Posteriormente, se realizó la cronoamperometría en estática durante 300 segundos. En la Figura 51 se muestra la diferencia de corrientes con y sin muestra real, también se apreció una estabilización de la corriente después de los 150 segundos. El valor de la corriente se consideró a los 200 segundos, calculando una concentración de AU en el voluntario 1 de 236.20 μM .

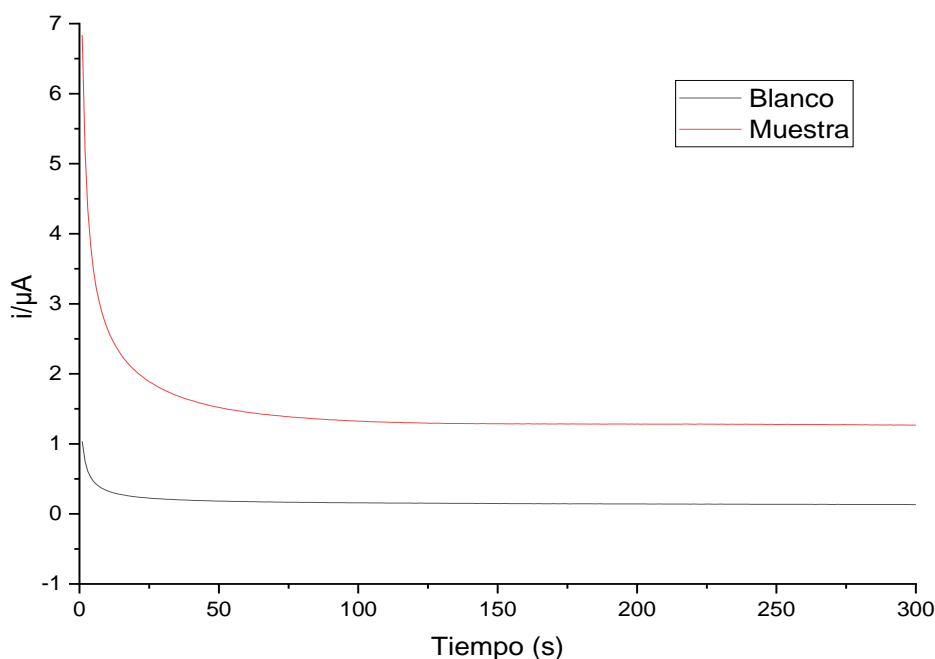


Figura 51 Cronoamperometría en estática, 2 mL de PBS y 2 mL de suero. Volumen final 4 mL.

7.5.2 Voluntario 2

En la Figura 52, se observó el pico de oxidación a 0.35 V, con un diferencial de corriente de 5.5 μA , lo que rectificó un correcto funcionamiento del biosensor con muestras reales. También se observó mayor corriente en comparación al voluntario 1 y el mismo corrimiento de la curva hacia la derecha.

En la Figura 53, se muestra la cronoamperometría en agitación, donde inicialmente se tenía 2 mL de PBS y posteriormente se agregó el suero, primero 1 mL y después dos adiciones de 0.5 mL.

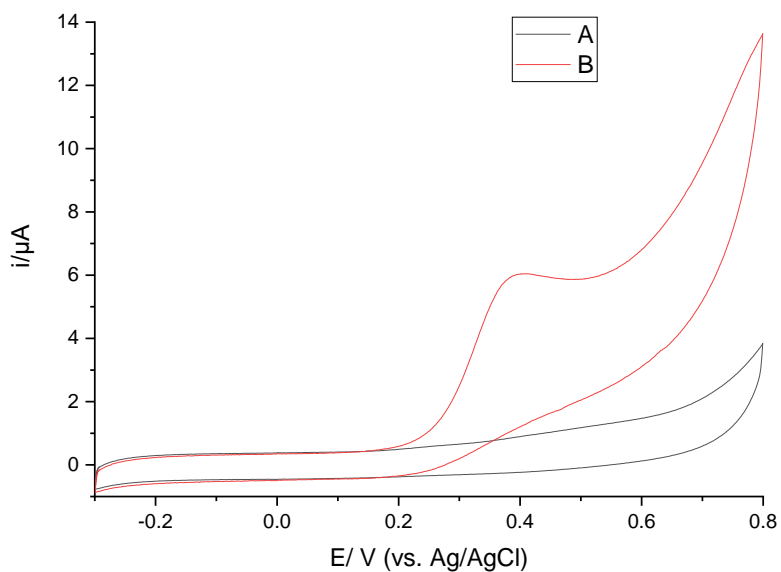


Figura 52 (A) VC sin adición de muestra. (B) VC con muestra real 2 mL de suero. Ambas con 2 mL de PBS a pH 7.4.

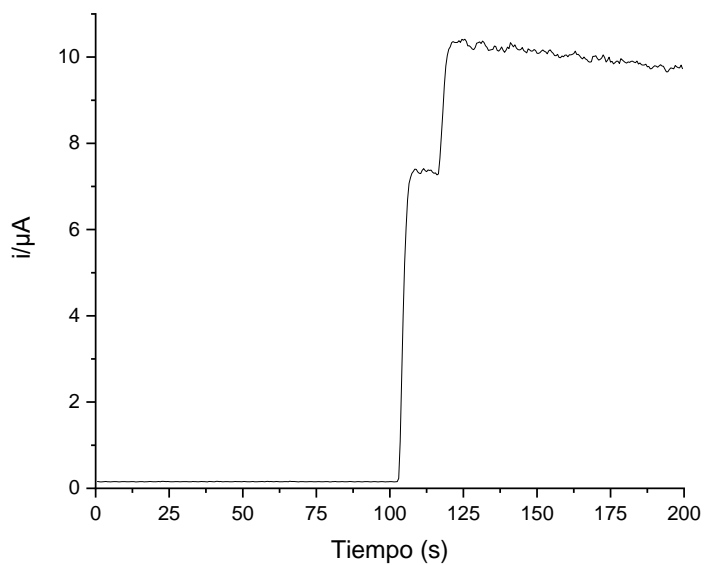


Figura 53 Cronoamperometría en agitación, 2 mL de PBS y adiciones de suero. Volumen final 4 mL.

Se obtuvo mayor corriente en comparación al voluntario 1 y solo se observaron 2 escalones, esto debido a que el salto de corriente fue mayor. El valor de la concentración de AU en el voluntario 2 captada por el biosensor fue de 504.86 μM .

Finalmente, en la Figura 54 se analizó el resultado obtenido de la cronoamperometría en estática, donde la corriente se estabilizó a los 200 segundos, diferente al voluntario 1, esto debido al ser una mayor contratación de AU en el suero. Se calculó el resultado con el nivel de corriente y la concentración de AU en el voluntario 2 fue de 456.69 μM .

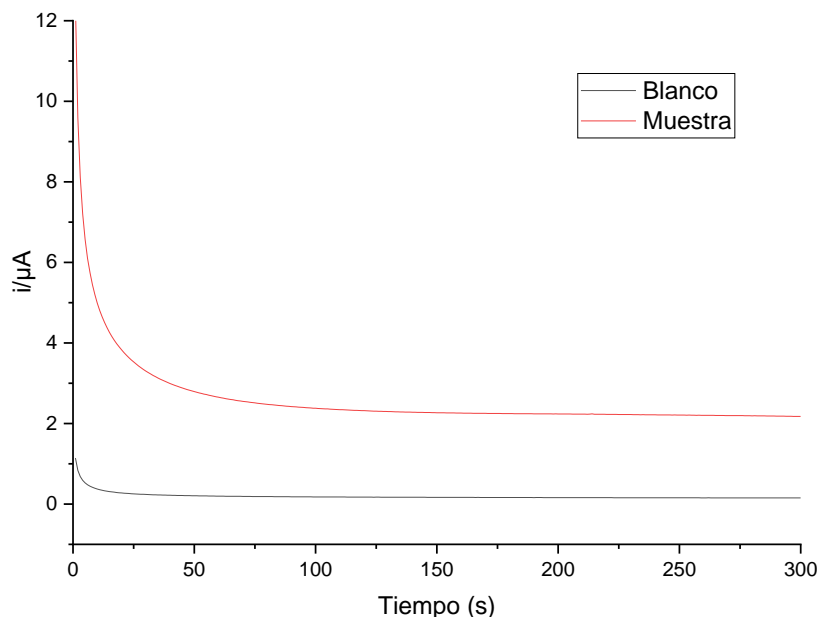


Figura 54 Cronoamperometría en estática, 2 mL de PBS y 2 mL de suero. Volumen final 4 mL.

Al realizar la comparación de los resultados arrojados en las diferentes metodologías de evaluación, se observan discrepancias entre estas, pero con cierta similitud en los valores obtenidos. Si bien, no se puede saber la concentración real de las muestras proporcionadas, los resultados hacen sentido con la literatura, considerando que el voluntario 1 no presenta rasgos físicos para considerar una posible concentración alta de AU, mientras que el voluntario 2, presenta sobrepeso,



un factor relevante para una concentración alta de AU. Cabe resaltar que son resultados preliminares y faltaría estandarizarlos, sin embargo, son resultados favorables ya que se obtuvieron electrodos funcionales a la AU vía enzimática.

8 Conclusiones

En la inmovilización de la enzima con los tres tipos de nanopartículas, se obtuvieron mejores resultados con MWCNT-COOH. La principal dificultad que se presentó con esta nanopartícula, fue la baja reproducibilidad, donde la corriente máxima era variable, siendo la de menor valor de 78 μA y la de mayor de 145 μA . También se tomaron en cuenta los datos como K_m , límite de detección y cuantificación, dando como la mejor opción las CNF, donde se obtuvo una K_m de 9.68 μA , límite de detección de 1.02 μA y una R^2 de 0.99 en el rango 0-1600 μM .

En segundo lugar, se optimizaron las relaciones estequiométricas, tanto de CNF como de UOx. Se realizó una prueba con una concentración muy baja de CNF, donde se observaron corrientes muy bajas, comprobando que el uso de la nanopartícula ayudó al desarrollo del proyecto para la obtención de excelentes resultados. Las concentraciones óptimas fueron las siguientes: 5 mg mL^{-1} de UOx y 10 mg mL^{-1} de CNF. El resto de concentraciones fueron descartadas debido a la inconsistencia de los resultados obtenidos. Se obtuvo un valor de K_m de 12.64 μA , límite de detección de 0.92 μA y una R^2 de 0.97 en el rango 0-1600 μM .

En diferentes valores de pH, los cuales fueron: 4.5, 5.7 y 7.4 presentaron actividad catalítica en la oxidación de AU. Estos fueron elegidos debido a que son valores que se encuentran en fluidos biológicos. Los resultados obtenidos mostraron que, en estos rangos de pH, el biosensor funciona correctamente, obteniendo pequeñas disminuciones de corriente en pH ácido, por lo tanto, el biosensor se puede utilizar en un rango de pH de 4.5 a 8.8, considerando estas variaciones previamente mencionadas.



Una vez que se obtuvo los efectos del pH sobre el biosensor, se continuó con la prueba de interferentes, donde se evaluó el biosensor en el pH 5.7 y 7.4. Durante la evaluación en pH 5.7, la concentración de ácido láctico en sudor (100 μM) afectó directamente al biosensor, causando una caída de corriente, en cambio, en pH 7.4, la concentración de ácido láctico en sangre (9 μM) no causó caída de corriente. Respecto al resto de interferentes, no mostraron relevancia, debido a que presentaban un porcentaje de afectación menor al 10 % con respecto al AU.

Finalmente, con base en los resultados obtenidos de los interferentes, se procedió a probar el biosensor con muestras reales, considerando que se utilizó un factor de dilución igual a 2. Estas pruebas se realizaron de dos formas, en estática y en agitación, donde se obtuvieron resultados similares. Sin embargo, los resultados fueron gratificantes a causa de que la VC mostró el pico de oxidación, los cambios entre la corriente inicial y final fueron evidentes, se utilizaron las curvas de calibración para obtener las concentraciones finales y esos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura. Voluntario 1, 192.3 μM , no presentó al momento algún tipo de problema renal o cardiovascular, coincidiendo con lo detectado por el biosensor, un valor estable-bajo de AU. Voluntario 2, 504.86 μM , presentando obesidad, se obtuvo un valor estable-alto de AU.

Con todos los resultados obtenidos y analizados, se concluye que la hipótesis y los objetivos planteados fueron cumplidos de forma satisfactoria y como se muestra en la tabla 7, se mejoraron aspectos importantes en comparación a trabajos reportados.

9 Perspectivas

En la prueba de interferentes, se descartó la opción probar el biosensor en pH 4.5, esto a causa de la alta concentración de ácido láctico que se encuentra en el sudor. Dicha concentración provocaba el decaimiento de la corriente bruscamente, dejando inservible el biosensor. Se deben seguir analizando opciones para evitar



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Ingeniería en Nanotecnología

este cambio brusco de la corriente, poder realizar las pruebas en sudor sin mayores dificultades y lograr que la toma de la muestra no sea invasiva.

Al realizar las estáticas en plano, los resultados que se obtuvieron fueron poco satisfactorios. Si bien se logró la detección de ácido úrico, las corrientes obtenidas fueron muy bajas, lo que provocó un gran aumento en el valor de la Km, lo que indicaría una baja afinidad entre analito y sustrato. Es por ello que se requiere mejorar el sistema en plano y obtener valores más cercanos a las estáticas en plano realizadas en el vaso de 10 mL.

Finalmente se planea seguir con el desarrollo del proyecto implementando la parte electrónica, desarrollando un circuito electrónico que detecte la corriente generada y envíe los datos al celular mediante una aplicación.



10 Bibliografías

- [1] G. Ndrepepa, "Uric acid and cardiovascular disease," *Clin. Chim. Acta*, vol. 484, no. March, pp. 150–163, 2018, doi: 10.1016/j.cca.2018.05.046.
- [2] R. C. Oliveira, E. P. dan Burini, "High Plasma Uric Acid Concentration: Causes and Consequences. Diabetology and Metabolic Syndrome.," vol. 4, no. 12, pp. 1–7, 2012.
- [3] J. Maiuolo, F. Oppedisano, S. Gratteri, C. Muscoli, and V. Mollace, "Regulation of uric acid metabolism and excretion," *Int. J. Cardiol.*, vol. 213, pp. 8–14, 2016, doi: 10.1016/j.ijcard.2015.08.109.
- [4] M. Alex Valenzuela, "Acido úrico ¿un nuevo factor contribuyente al desarrollo de obesidad?," *Rev. Chil. Nutr.*, vol. 43, no. 3, pp. 303–307, 2016, doi: 10.4067/S0717-75182016000300011.
- [5] A. K. Mandal and D. B. Mount, "The molecular physiology of uric acid homeostasis," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 77, no. October, pp. 323–345, 2015, doi: 10.1146/annurev-physiol-021113-170343.
- [6] V. M. García-Nieto *et al.*, "La gota asociada a reducción de la excreción renal de ácido úrico. Esa tubulopatía que no tratamos los nefrólogos," *Nefrología*, vol. 42, no. 3, pp. 273–279, 2022, doi: 10.1016/j.nefro.2021.03.013.
- [7] Y. L. Nian and C. G. You, "Susceptibility genes of hyperuricemia and gout," *Hereditas*, vol. 159, no. 1, pp. 1–11, 2022, doi: 10.1186/s41065-022-00243-y.
- [8] S. J. Zhao, Y. G. Zu, M. Lu, X. W. Jia, and X. Chen, "Effect of Tai Chi on cardiac function in patients with myocardial infarction: A protocol for a randomized controlled trial," *Medicine (Baltimore)*, vol. 100, no. 42, p. e27446, 2021, doi: 10.1097/MD.00000000000027446.
- [9] A. Guzmán *et al.*, "Effectiveness of interventions for the reversal of a metabolic syndrome diagnosis: An update of a meta-analysis of mixed treatment comparison studies," *Biomedica*, vol. 39, no. 4, pp. 647–662, 2019, doi: 10.7705/BIOMEDICA.4684.



- [10] S. J. Lee, B. K. Oh, and K.-C. Sung, "Uric acid and cardiometabolic diseases," *Clin. Hypertens.*, vol. 26, no. 1, pp. 1–7, 2020, doi: 10.1186/s40885-020-00146-y.
- [11] Q. Wang, X. Wen, and J. Kong, "Recent Progress on Uric Acid Detection: A Review," *Crit. Rev. Anal. Chem.*, vol. 50, no. 4, pp. 359–375, 2020, doi: 10.1080/10408347.2019.1637711.
- [12] Y. Zhao, X. Yang, W. Lu, H. Liao, and F. Liao, "Uricase based methods for determination of uric acid in serum," *Microchim. Acta*, vol. 164, no. 1–2, pp. 1–6, 2009, doi: 10.1007/s00604-008-0044-z.
- [13] G. Rocchitta *et al.*, "Enzyme biosensors for biomedical applications: Strategies for safeguarding analytical performances in biological fluids," *Sensors (Switzerland)*, vol. 16, no. 6, 2016, doi: 10.3390/s16060780.
- [14] M. B. Kulkarni, N. H. Ayachit, and T. M. Aminabhavi, "Biosensors and Microfluidic Biosensors: From Fabrication to Application," *Biosensors*, vol. 12, no. 7, 2022, doi: 10.3390/bios12070543.
- [15] S. Kurbanoglu, S. A. Ozkan, and A. Merkoçi, "Nanomaterials-based enzyme electrochemical biosensors operating through inhibition for biosensing applications," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 89, no. June 2016, pp. 886–898, 2017, doi: 10.1016/j.bios.2016.09.102.
- [16] N. Kaur and N. Prabhakar, "Current scenario in organophosphates detection using electrochemical biosensors," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 92, pp. 62–85, 2017, doi: 10.1016/j.trac.2017.04.012.
- [17] H. H. Nguyen, S. H. Lee, U. J. Lee, C. D. Fermin, and M. Kim, "Immobilized enzymes in biosensor applications," *Materials (Basel)*, vol. 12, no. 1, pp. 1–34, 2019, doi: 10.3390/ma12010121.
- [18] F. Schachinger, H. Chang, S. Scheiblbrandner, and R. Ludwig, "Amperometric biosensors based on direct electron transfer enzymes," *Molecules*, vol. 26, no. 15, 2021, doi: 10.3390/molecules26154525.
- [19] P. Bollella and L. Gorton, "Enzyme based amperometric biosensors," *Curr. Opin. Electrochem.*, vol. 10, pp. 157–173, 2018, doi: 10.1016/j.coelec.2018.06.003.
-



- [20] S. Dede and F. Altay, "Biosensors from the first generation to nano-biosensors," *Int Adv Res Eng J*, no. August, 2018.
- [21] G. Alarcon-Angeles, G. A. Álvarez-Romero, and A. Merkoçi, "Electrochemical biosensors: Enzyme kinetics and role of nanomaterials," *Encycl. Interfacial Chem. Surf. Sci. Electrochem.*, pp. 140–155, 2018, doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.13477-8.
- [22] M. L. Cacicedo *et al.*, *Immobilized enzymes and their applications*. 2019.
- [23] H. Chu, X. Wei, M. Wu, J. Yan, and Y. Tu, "An electrochemiluminescent biosensor based on polypyrrole immobilized uricase for ultrasensitive uric acid detection," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 163, no. 1, pp. 247–252, 2012, doi: 10.1016/j.snb.2012.01.047.
- [24] T. Falohun and M. J. McShane, "An optical urate biosensor based on urate oxidase and long-lifetime metalloporphyrins," *Sensors (Switzerland)*, vol. 20, no. 4, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3390/s20040959.
- [25] S. Verma, J. Choudhary, K. P. Singh, P. Chandra, and S. P. Singh, "Uricase grafted nanoconducting matrix based electrochemical biosensor for ultrafast uric acid detection in human serum samples," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 130, pp. 333–341, 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.121.
- [26] J. Kan, X. Pan, and C. Chen, "Polyaniline-uricase biosensor prepared with template process," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 19, no. 12, pp. 1635–1640, 2004, doi: 10.1016/j.bios.2003.12.032.
- [27] G. Nuki, *Uricase therapy of gout*. Elsevier, 2012.
- [28] Z. Taherimehr, M. Zaboli, and M. Torkzadeh-Mahani, "New insight into the molecular mechanism of the trehalose effect on urate oxidase stability," *J. Biomol. Struct. Dyn.*, vol. 40, no. 4, pp. 1461–1471, 2022, doi: 10.1080/07391102.2020.1828167.
- [29] A. K. Nelapati, B. K. Das, J. B. Ponnann Ettiappan, and D. Chakraborty, "In-silico epitope identification and design of Uricase mutein with reduced immunogenicity," *Process Biochem.*, vol. 92, pp. 288–302, 2020, doi: 10.1016/j.procbio.2020.01.022.
-



- [30] A. Nayab, S. A. Moududee, Y. Shi, Y. Jiang, and Q. Gong, "Crystal Structure of Urate Oxidase from *Bacillus Subtilis* 168," *Crystallogr. Reports*, vol. 64, no. 7, pp. 1126–1133, 2019, doi: 10.1134/S1063774519070149.
- [31] F. Gutierrez, M. D. Rubianes, and G. A. Rivas, "Dispersion of multi-wall carbon nanotubes in glucose oxidase: Characterization and analytical applications for glucose biosensing," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 161, no. 1, pp. 191–197, 2012, doi: 10.1016/j.snb.2011.10.010.
- [32] E. Silveira *et al.*, "International Journal of Biological Macromolecules Chitosan – based nanofibers for enzyme immobilization," vol. 183, no. May, pp. 1959–1970, 2021.
- [33] R. S. Singh and K. Chauhan, "Immobilization of Inulinase on Aminated Multiwalled Carbon Nanotubes by Glutaraldehyde Cross-Linking for the Production of Fructose," *Catal. Letters*, vol. 149, no. 10, pp. 2718–2727, 2019, doi: 10.1007/s10562-019-02743-5.
- [34] G. Cross-linking and T. J. A. Johnson, "Glutaraldehyde Cross-Linking," 1993.
- [35] M. Sharon and Maheshwar Sharon, "*Carbon nanofibers: fundamentals and applications*," vol. 3, no. April. 2021.
- [36] R. T. K. Baker and C. M. Llc, "Carbon Nano fibers \$," pp. 1–11, 2016, doi: 10.1016/B978-0-12-803581-8.02294-3.
- [37] S. Jain, S. Verma, S. P. Singh, and S. N. Sharma, "An electrochemical biosensor based on novel butylamine capped CZTS nanoparticles immobilized by uricase for uric acid detection," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 127, pp. 135–141, 2019, doi: 10.1016/j.bios.2018.12.008.
- [38] Y. Liu, M. Yuan, L. Liu, and R. Guo, "A facile electrochemical uricase biosensor designed from gold/amino acid nanocomposites," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 176, pp. 592–597, 2013, doi: 10.1016/j.snb.2012.08.058.
-



11 Anexos



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE QUERÉTARO



El Comité Organizador otorga la presente

CONSTANCIA

a:

**Landeros Alamilla Bryan Modesto y Janet Ledesma
García**

Con el proyecto "Biosensor electroquímico de ácido úrico para fluidos
biológicos"

Por su valiosa participación en el Foro Académico en modalidad virtual
que se llevó a cabo los días 18 y 19 de enero de 2022

Universidad Autónoma de Querétaro


Dr. Javier Ávila Morales
Secretario Académico


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

SOMOSUAQ
SERVIR CONSTRUIR TRANSFORMAR