



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Maestría en Ciencias

DESARROLLO DE UN SENSOR NANOFLUÍDICO MULTIPARAMÉTRICO PARA
LA DETECCIÓN DE UREA Y CREATININA EN SALIVA, DIRIGIDO A
ENFERMOS RENALES CRÓNICOS

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta

Margarita Gpe. García Barajas

Dirigida por:

Dra. Minerva Guerra Balcázar

Co-dirigida por:

Dra. Janet Ledesma García

Dra. Minerva Guerra Balcázar
PRESIDENTE

Dra. Janet Ledesma García
SECRETARIO

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña
VOCAL

Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa
SUPLENTE

Dr. Ricardo Antonio Escalona Villalpando
SUPLENTE

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Fecha de aprobación por el Consejo Universitario (mes y año)
México

A quién fue el motor de cada mañana.
A quién me inspiró para continuar día con día.
A quién sacrificó tanto como yo.
A mi hijo.

EMILIANO

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a el CONACYT por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

Agradezco al LABMyN sede Querétaro, por su apoyo y soporte durante el desarrollo experimental.

Agradezco a mi asesor de tesis, la Dra. Minerva Guerra Balcázar, por su tiempo dedicado a está investigación, así como su apoyo y asesoramiento.

Agradezco a los miembros del sínodo, la Dra. Janet Ledesma, Dr. Eduardo Elizalde y Dr. Ricardo Escalona, por sus valiosas contribuciones al trabajo final, y por el tiempo dedicado a la revisión.

Agradezco enormemente al Dr. Juan de Dios Galindo, por su soporte en la metodología, experimentación y discusión de resultados, pero también con su claridad y contención anímica.

Agradezco a mi esposo Jorge López, por el soporte en esta travesía, por nunca dudar de mi y por el apoyo incondicional que me ha brindado desde hace 7 años, porque sin él, no estaría en este barco.

Agradezco a mis padres, por ser motivación y fuente de inspiración, y a mis hermanas las cuales siempre me han incentivado a llegar tan alto como ellas.

Agradezco a mis compañeros en el posgrado, Ileri Segura por tanto, tanto apoyo fuera y dentro del laboratorio, porque seguramente ha sido pieza clave en la realización de esta tesis. Igualmente a Fernando Morelos por los análisis y apoyo brindado.

Índice de Tablas	6
Índice Figuras	8
RESUMEN	10
ABSTRACT.....	11
1. Introducción.....	12
1.1 Justificación	16
2. Antecedentes.....	17
2.1 Enfermedad Renal Crónica (ERC)	17
2.2 Composición de la saliva	19
2.4 Sensores de creatinina.....	21
2.4.1 Molécula de creatinina.....	22
2.4.2 Formación de complejos	22
2.4.3 Complejos de creatinina.....	23
2.4.4 Complejos cobre-creatinina	24
2.5. Sensor de Urea.....	24
2.5.1 Polímeros Conductores	25
2.5.1.1 Polianilina en el sensado selectivo de Urea	27
2.5.2 Funcionalización de Nanotubos de Carbón Multipared (NTC)	29
2.5.3 Métodos de Inmovilización.....	30
Hipótesis	33
Objetivo General.....	33
Objetivos específicos	33
3. Metodología	34
3.1. Sensor de creatinina	34

3.1.2	Caracterización del material CuAg	35
3.1.4	Cuantificación de creatinina	36
3.1.5	Pruebas de interferencia	36
3.2	Sensor de Urea	37
3.2.4	Caracterización del electrodo	38
3.2.4	Cuantificación de la urea	39
3.2.5	Pruebas de interferencia	39
3.3	Pruebas en fluidos simulados de saliva	39
4.	Resultados	41
4.2	Caracterización del material CuAg.....	41
4.2	Caracterización electroquímica	44
4.3	Pruebas de interferencia de creatinina	52
4.4	Formación del composito PANI/MWCNT sobre papel toray	57
4.5	Morfología del electrodo.....	57
4.6	Caracterización del electrodo de Urea	59
	61
4.7	Cuantificación de Urea	62
4.8	LDD y LDC para urea	64
4.9	Pruebas de interferencia para urea	64
4.10	Pruebas en fluidos simulados	66
5.	Conclusión	75
6.	Anexos	76
6.2	Perspectivas.....	76
6.2	Productos	77
7.	Referencias	78

Índice de Tablas

Tabla 1. Sensores desarrollados con saliva (Bandodkar y col., 2014)	13
Tabla 2. Características de los biosensores de urea (Singh y col., 2008).	14
Tabla 3. Características y valores de TFG de acuerdo con las etapas de la ERC (Ávila-Saldívar, 2013).....	17
Tabla 4. Parámetros en sangre de creatinina y urea en pacientes sanos y enfermos (ZHYBAK, M. Y COL., 2016).....	18
Tabla 5. Concentraciones de Creatinina y Urea en individuos sanos y ERC (Tomás I. y col., 2008).	19
Tabla 6. Clasificación de sensores electroquímicos (Stradiotto y col., 2003) 20	
Tabla 7. Polímeros conductores utilizados para el desarrollo de biosensores (Ates, M. 2013).	26
Tabla 8. Ventajas y desventajas de los métodos de inmovilización (Singh, M. y col., 2008).....	32
Tabla 9. Soluciones para síntesis del material CuAg	34
Tabla 10. Composición de tinta catalítica	35
Tabla 11. Composición de saliva simulada (Mutlu, I., y Oktay, E., 2013).....	40
Tabla 12. Concentración y porcentaje del material por XRF.....	42
Tabla 13. Propiedades cristalográficas del material CuAg	44
Tabla 14. Relación de las concentraciones de creatinina y la variación de corriente en mA.....	48
Tabla 15. Variaciones de corriente normalizadas y desviación estándar del blanco.....	49
Tabla 16. Valores presentes en saliva para pacientes control y terminal.	50
Tabla 17. Valores de corriente para los interferentes de creatinina en mAcm^{-2}.	54
Tabla 18. Valores de reportados para errores estándar entre medias (SED) y diferencia entre medias (Prueba t).	54
Tabla 19. Sensores no enzimáticos reportados	56

Tabla 20. Relación de las concentraciones de urea y la variación de potencial en Volts.	63
Tabla 21. Valores de urea en mM reportados para pacientes control y terminal	64
Tabla 22. Valores de corriente para interfenetes de urea en mA cm⁻².....	65
Tabla 23. Valores de reportados para errores estándar entre medias (SED) y diferencia entre medias (Prueba t).	66
Tabla 24. Relación de las concentraciones de creatinina y la variación de corriente en mAcm⁻² en fluido simulado pH 7.	70
Tabla 25. Relación de las concentraciones de urea en fluido simulado y la variación de potencial Volts.....	73

Dirección General de Bibliotecas UNQ

Índice Figuras

FIGURA 1. Tipos de sensores electroquímicos	21
FIGURA 2. Estructuras tautoméricas para la creatinina.....	22
FIGURA 3. Mecanismo general de detección de iones amonio con películas de PANI.....	28
FIGURA 4. Enlace de nanotubos de carbono sobre películas de PANI.....	29
FIGURA 5. Funcionalización de NTC.....	30
FIGURA 6. Representación de los diferentes métodos de inmovilización	31
FIGURA 7. Micrografías de SEM obtenida para CuAg.....	41
FIGURA 8. Espectro para el material de CuAg obtenido por XRF.....	42
FIGURA 9. Patrón de difracción de CuAg.....	43
FIGURA 10. Voltamperometría cíclica del electrodo modificado C/CuAg en presencia y ausencia de creatinina en solución buffer de fosfatos pH 7 a 20mVs⁻¹.....	45
FIGURA 11. Voltamperometría cíclica del electrodo modificado C/CuAg solución buffer de fosfatos pH 7 con 40 ciclos a 20mVs-1	45
FIGURA 12. Voltamperometría cíclica del electrodo modificado C/CuAg con diferentes concentraciones de creatinina en solución buffer de fosfatos pH 7 a 20mVs-1.....	47
FIGURA 13. Voltamperometría de pulso diferencial C/CuAg con diferentes concentraciones de creatinina en solución buffer de fosfatos pH 7	47
FIGURA 14. Curva de calibración de creatinina.....	48
FIGURA 15. Cronoamperometría de creatinina en buffer de fosfatos pH 7....	50
FIGURA 16. Curva de calibración por cronoamperometría en potencial 0.35 V.	51
FIGURA 17. Voltamperometría cíclicas de interferentes y Creatinina en buffer de fosfatos a 20mVs¹	52
FIGURA 18. Polimerización de anilina/NTC a 20mVs-1 sobre papel toray.	57
FIGURA 19. Imagen SEM de electrodos.....	58
FIGURA 20. Efecto del pH y la temperatura a pH 7 sobre enzima libre e inmovilizada en electrodos de PANI/NTC	59

FIGURA 21. Cinética de anclaje de proteína sobre electrodo PANI/NTC/Urs a 55°C	60
FIGURA 22. Voltamperometría cíclica de los electrodos de PANI, PANI/NTC y PANI/NTC/Urs en buffer pH 7 a 20mVs⁻¹.	61
FIGURA 23. Voltamperometría cíclica del electrodo modificado PANI/NTC/Urs en presencia y ausencia de urea a 20mVs⁻¹	61
FIGURA 24. Cronopotenciometría de urea en buffer de fosfatos pH 7.....	62
FIGURA 25. Curva de calibración de urea.	63
FIGURA 26. Voltamperometría cíclica de urea y CaCl₂, NaCl, KCl en presencia de urea en buffer de fosfatos a 20mVs⁻¹	65
FIGURA 27. Voltamperometría cíclica en buffer de fosfatos y Fluido simulado a 20mVs⁻¹.....	67
FIGURA 28. Voltamperometría cíclica en Fluido simulado pH 7.0 en presencia y ausencia de creatinina a 20mVs⁻¹.....	68
FIGURA 29. Voltamperometría cíclica del electrodo modificado C/CuAg con diferentes concentraciones de creatinina en fluido simulado pH 7 a 20mVs⁻¹	68
FIGURA 30. Voltamperometría de Pulso Diferencial del electrodo modificado C/CuAg con concentraciones de 30-150 μM de creatinina en fluido simulado pH 7.....	69
FIGURA 31. Curva de calibración de diferentes concentraciones de creatinina en fluido simulado pH 7.....	69
FIGURA 32. Voltamperometría de Pulso Diferencial del electrodo modificado C/CuAg con concentraciones de 150 – 300 μM de creatinina en fluido simulado pH 7.....	70
FIGURA 33. Voltamperometría cíclica del electrodo modificado PANI/NTC/Urs en fluido simulado y buffer de fosfatos pH 7 a 20mVs⁻¹.....	71
FIGURA 34. Cronopotenciometría de urea en fluido simulado pH 7.....	72
FIGURA 35. . Curva de calibración de urea en fluido simulado de saliva pH 7	73
Figura 36. Diseño de celda para el sensado de creatinina y urea simultanea	76

RESUMEN

La insuficiencia renal crónica (ERC) es un padecimiento derivado de un fallo en el sistema renal, el cual es detectado con la presencia de creatinina y urea en sangre u orina, sin embargo, la obtención de la muestra suele ser doloroso e incomodo para los pacientes. El presente trabajo busca desarrollar un sistema de sensado no invasivo para una detección eficiente y oportuna de urea y creatinina en los pacientes.

Para la detección de creatinina, se desarrolló un sensor no enzimático, basado en un material de CuAg, mientras que para la detección de urea se inmovilizó la enzima ureasa sobre una película de polianilina y nanotubos de carbón (PANI/NTC). El electrodo de creatinina presentó interferencia con ácido ascórbico y ácido úrico, mientras que el electrodo para urea presentó interferencia con CaCl_2 . Sin embargo, ambos electrodos mostraron un bajo límite de detección y respuesta lineal tanto en buffer de fosfatos como en fluido simulado de saliva, por lo cual es posible realizar una cuantificación exitosa con los electrodos desarrollados.

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is a condition derived from a failure in the renal system, which is detected with the presence of creatinine and urea in the blood or urine, however, this obtaining the sample is painful and uncomfortable for patients. The present work seeks for a non-invasive sensing system efficient and timely for detection of urea and creatinine in patients with chronic kidney disease.

For the detection of creatinine, a non-enzymatic sensor was developed, it based on a CuAg material, while for the detection of urea; urease enzyme was immobilized on a polyaniline film and carbon nanotubes (PANI / MWTC). The creatinine electrode presented interference with ascorbic acid and uric acid, while the urea electrode presented interference with CaCl_2 . Both electrodes showed a low detection limit and linear response in phosphate buffer and simulated saliva fluid, for which it is possible to perform a successful quantification with the developed electrodes.

1. Introducción

Hoy en día uno de los principales desafíos con los que se encuentra la medicina, está relacionado con el desarrollo de herramientas que replacen los análisis clínicos en búsqueda de mejores tiempos de respuesta y bajos costos (Lechuga, 2011). El desarrollo de dispositivos electroquímicos que cuantifiquen parámetros médicos ha tomado fuerza a partir de la comercialización del glucómetro desarrollado por Clark y Lyons en 1962, el cual utiliza a la enzima glucosa oxidasa inmovilizada para la detección de glucosa en pacientes con diabetes (Bandodkar y col., 2014).

Este tipo de dispositivos han permitido que los pacientes puedan monitorear parámetros clínicos de forma fiable en cualquier lugar. Sin embargo, las demandas por dispositivos de análisis clínicos son cada vez más exigentes, dado que se busca equipos capaces de realizar varios análisis en con un solo equipo.

La respuesta a las necesidades actuales se está basando en las plataformas Lab-on-a-chip (LOAC), las cuales integran secuencias de procesos de un laboratorio en volúmenes de muestra micro o nanométricos en sistemas de flujo controlado (Tejeda, Pardo & Cuadro, 2011), lo que permite la detección en tiempo real, mejorando la sensibilidad y portabilidad de los equipos (Lechuga, 2011).

Por otra parte, se tienen prototipos que buscan realizar los análisis clásicos con sensores no invasivos a partir de muestras de saliva, sudor, lagrimas u otros fluidos corporales. En el caso específico de la saliva (la cual es una excelente alternativa para sustituir los análisis de sangre porque no requiere pretratamiento, además de presentar una relación lineal respecto a la composición de la sangre) se ha utilizado para el desarrollo del primer sensor portátil que se fabricó fue para detectar lactato, algunos de los estudios posteriores se pueden observar en la tabla 1 (Bandodkar y col., 2014).

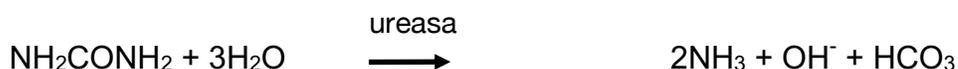
Tabla 1. Sensores desarrollados con saliva (Bandodkar y col., 2014)

Plataforma	Elemento de Reconocimiento	Técnica	Analito
Dentadura	Membrana de vidrio	Potenciometrica	pH
Fluoruro de Lantano	Fluoruro de lantano	Potenciométrica	Fluoruro
Grafeno	Lactato oxidasa	Amperometrica	Lactato
Politetrafluoroetileno	Peptidos	Resistometria	Estafilococcus aureus

Sensor de Urea

Las muestras de saliva como alternativa no invasiva para el monitoreo de enfermos renales crónicos se reportó por primera vez en 1996 por Lloyd & Selby sin encontrar relación en sujetos sanos, pero si una relación significativa en pacientes con enfermedad renal crónica, lo cual daría como resultado en el dispositivo un falso positivo. Por otra parte, Negler en el 2008, reportó una relación entre los valores obtenidos de urea y potasio provenientes de sangre y saliva con una correlación de 0.85 y 0.5 respectivamente, mientras que Tomás I. y col. en el mismo año encontraron que la composición salival en pacientes con ERC (Enfermedad Renal Crónica) está condicionada por la etapa del paciente.

Las técnicas convencionales para la detección de creatinina y urea han involucrado el uso de enzimas debido a su alta selectividad y capacidad catalítica (Diaz Sánchez, 2017). Para la detección de urea, los sensores se han basado en el uso de la enzima ureasa, la cual hidroliza la urea como se muestra en la siguiente reacción.



La sensibilidad del electrodo está estrechamente relacionada con el método de inmovilización de la enzima sobre el electrodo de trabajo y el transductor, en el caso de la urea, existen diferentes trabajos realizados, los cuales varían de acuerdo con el objetivo a alcanzar.

La tabla 2 muestra diferentes biosensores utilizados en la detección de urea como sus características (Singh y col., 2008).

TABLA 2. Características de los biosensores de urea (Singh y col., 2008).

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

Sensor de creatinina

Para la detección de la creatinina el uso de electrodos modificados con enzimas no ha sido tan eficiente como la de la urea, dado que se presentan mucha interferencia como reporta Pugia y col. en el 2000 y donde se reporta una metodología alterna al uso de enzimas para la cuantificación a partir de complejos cobre-creatinina.

La creatinina presenta diferentes sitios de enlace en la molécula lo que le permite coordinarse con diferentes donantes (Mitewa M., 1995). En el 2017 Raveendra y col. proponen un sensor electroquímico, no enzimático para la cuantificación de creatinina, utilizando la actividad peroxidasa del complejo cobre-creatinina.

En el presente trabajo se implementó un arreglo de dos electrodos en un sistema microfluídico; el primer electrodo basado en una tinta catalítica compuesta de carbón vitro y un material de CuAg para la detección de creatinina, mediante la formación de un complejo.

El segundo electrodo la detección de urea fue a partir de la hidrolización de la misma con la enzima ureasa. La inmovilización se realizó sobre nanotubos de carbón previamente funcionalizados, los cuales se atraparon en una película de polianilina.

El uso de nanoestructuras nos permitió mejorar la transferencia de electrones, incrementando en consecuencia la sensibilidad, por lo cual se pudo sensar creatinina y urea en fluidos de baja concentración, como lo es la saliva.

1.1 Justificación

Desde el 2013 México se colocó en la segunda posición de la lista mundial de enfermos renales crónicos (Tamayo y Lastrí, 2016). De acuerdo con la Secretaría de Salud la ERC ocupa entre el 11% y 13% de la población mundial (Secretaría de Salud, 2018) y nuestro país encabeza la lista.

La cuantificación de urea y creatinina son indicadores de la función renal y el aumento directo de estos valores en sangre u orina indican una falla en el riñón (Kidneyurology, 2018). Por lo cual, es necesario desarrollar herramientas que permitan monitorear los metabolitos, antes mencionados, en tiempos cortos y de forma asertiva con el objetivo de mejorar la calidad de vida de los pacientes al obtener un diagnóstico médico adecuados (Mairhofer y col., 2009).

La creatinina y la urea son indicadores críticos de la función renal, los cuales requiere una determinación simultánea y en tiempo real en tratamientos de hemodiálisis (Reviejo y Pingarrón, 2000), pero los sensores desarrollados con este propósito se han trabajado de forma separada, debido a la baja concentración de creatinina y sus problemas con la sensibilidad cruzada al pH. La alternativa que se ha ofrecido es un sistema basado en electrodos selectivos de iones de amonio con una capa de enzimas mono-moleculares unidas covalentemente, sin embargo, se han trabajado únicamente en sangre u orina (Suzuki y col., 2005).

El uso de la sangre para las pruebas de diagnóstico es un proceso invasivo que involucra un alto riesgo de contraer enfermedades, además de que se asocia con nerviosismo y angustia de los pacientes, por lo cual un diagnóstico no invasivo, confiable en su resultado y que no deteriore la calidad de vida de los pacientes debe considerarse de suma importancia (Lasisi y col., 2016).

El presente trabajo se planteó desarrollar un microdispositivo que permita cuantificar los analitos de interés de forma simultánea en menor tiempo, en cualquier etapa de la enfermedad renal y de forma no invasiva, teniendo como objetivo ofrecer una herramienta eficiente de diagnóstico médico.

2. Antecedentes

2.1 Enfermedad Renal Crónica (ERC)

Se define como el daño funcional o estructural en el riñón, el cual es lento, progresivo e irreversible y se puede expresar por una reducción del aclaramiento de creatinina (TFG) estimado en valores de $<60\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ (Gómez, Arias y Jiménez, 2012). Se divide en 5 etapas diferentes como se muestra en la tabla 3 (Ávila-Saldivar, 2013).

TABLA 3. Características y valores de TFG de acuerdo con las etapas de la ERC (Ávila-Saldivar, 2013)

Etapas	Características de pacientes con ERC	TFG mL/min/1.73m²
1	Pacientes con diabetes mellitus	>90
2	Paciente asintomático, pero con ligero daño renal asociado	89-60
3	Presencia de uremia y síntomas de hipertensión, anemia y alteraciones del metabolismo ósea	50-30
4	Existe un daño renal grave y alto riesgo a complicaciones cardíacas	30-15
5	Insuficiencia renal crónica terminal, el paciente requiere un tratamiento sustitutivo	<15

Dado que el riñón es el encargado de filtrar los desechos de la sangre para formar la orina, cuando existe una falla en el funcionamiento renal podemos encontrar residuos acumulados en la sangre (Kidneyurology, 2018), como la creatinina que es un producto final muscular y la urea, que es el residuo de la descomposición de las proteínas (Fernández, de Souza, de Oliveira & Chaves, 2018). También existen

iones como el potasio que, ante un daño renal, no es desechado en la orina y tiene altos niveles en la sangre provocando alteraciones en la función miocardiaca y en la respiración (Vázquez, 2009). Pacientes con ERC, pueden llegar a presentar un incremento de los valores de urea y creatinina en sangre. En la tabla 4 se presentan los valores reportados por Zhybak, M. y col., en el 2016 para dichos valores.

TABLA 4. Parámetros en sangre de creatinina y urea en pacientes sanos y enfermos (ZHYBAK, M. Y COL., 2016)

	Sano (μM)	Enfermo (mM)
Creatinina	1.7 – 8.1	50 -70
Urea	40 - 150	1 - 1.14

La detección de los valores previamente reportados se realiza mediante análisis de laboratorio en muestras de sangre y la evaluación de la etapa suele realizarse en muestras de orina y de forma recurrente (Snyder y Pendergraph, 2005).

El estudio realizado por Tomás I. y col., en el 2008 revelan las concentraciones en saliva de creatinina, urea, sodio, potasio, cloruro y alfa-amilasa, se ven modificadas en pacientes renales de acuerdo con la etapa en la que se encuentran, lo cual abre la puerta a la detección y monitoreo de la ERC en un fluido biológico de fácil acceso y que no requiere la laceración del dedo del paciente.

2.2 Composición de la saliva

La saliva es una secreción con una composición del 99% de agua y 1% de compuestos iónicos y orgánicos (de Almeida y col., 2008).

Los constituyentes del plasma sanguíneo se pueden encontrar en la saliva, pero en concentraciones más bajas, los constituyentes inorgánicos que se pueden encontrar son los cationes Ca^{+2} y K^{+} , mientras que los compuestos orgánicos tenemos las proteínas en forma de enzimas además de maltasa, albúmina sérica, urea, ácido úrico, creatinina, mucina, ácido ascórbico, varios aminoácidos, lactato y algunas hormonas como la testosterona y el cortisol. Siendo los niveles salivales de K^{+} , Ca^{+2} , urea, ácido úrico y creatinina los que están altamente correlacionados con los que existen en el plasma (Chicharro y col., 1998).

En el caso de la composición de enfermos renales, Tomás y col., en el 2008 reportar las concentraciones que se muestran en la tabla 5, para muestras en sangre y saliva, por métodos de análisis clínicos convencionales. La estrecha relación que guarda la saliva con el plasma sanguíneo ha generado la pauta para el desarrollo de métodos de diagnóstico clínicos más eficientes como son los Lab on a Chip (Bandodkar, & Wang, 2014).

TABLA 5. Concentraciones de Creatinina y Urea en individuos sanos y ERC (Tomás I. y col., 2008).

mgdL ⁻¹		Paciente		
		Control	Moderado	Terminal
SANGRE	Creatinina	0.91	2.39	8.86
	Urea	0.03	0.11	0.17
SALIVA	Creatinina	0.35	0.34	1.11
	Urea	0.04	0.10	0.15

2.3 Sensores

Un sensor esta conformado por un receptor y transductor, aquellos que usan una enzima, un anticuerpo, un ácido nucleico o una célula como receptor se denominan biosensores (Monosik, Stredansky & Sturdik, 2012). El transductor clasifica al sensor como electroquímico, eléctrico, óptico, piezoeléctrico y térmico (Monosik, Stredansky & Sturdik, 2012).

Un arreglo de sensores en dispositivos Lab on a Chip presentan un rento, debido a que reducir el tamaño de muestra también implica reducir el material a detectar, por lo cual se requiere de mayor sensibilidad.

Un sensor con un transductor electroquímico presenta mucha ventaja sobre los análisis, dado a que las medidas electroquímicas pueden llevarse a cabo en volúmenes pequeños de muestra, la señal que se obtiene es eléctrica, por lo cual es fácil convertirla a una señal de lectura y presenta buenos límites de detección (Reviejo y Pingarrón, 2000). Los sensores electroquímicos presentan una variedad de clasificaciones (Tabla 6 y Figura 1) y la elección depende de la naturaleza del analito.

TABLA 6. Clasificación de sensores electroquímicos (Stradiotto y col., 2003)

Amperométrico	Oxida y reduce una especie. Mide una corriente resultante
Potenciométrico	Se obtiene información sobre la composición de una muestra a partir de la diferencia de potencial entre electrodos
Conductimétrico	Mide la conductividad de una serie de frecuencias

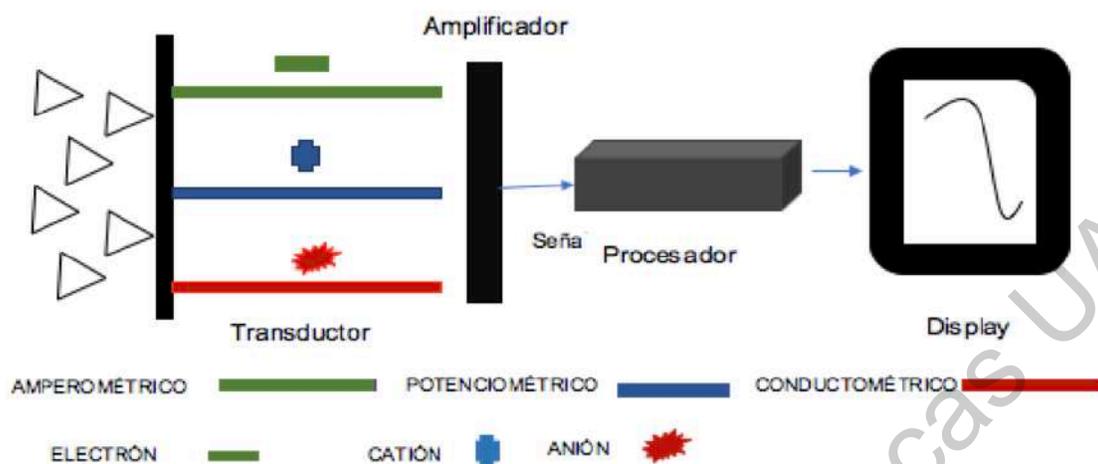


FIGURA 1. Tipos de sensores electroquímicos

2.4 Sensores de creatinina

La creatinina (2-amino-1metil-5H-imidazol-4-ona) es un componente que se encuentra presente en la sangre humana y en la orina (Pundir, C. S. y col., 2019), se deriva de la deshidratación de la creatina y la fosfocreatina presentes en la masa muscular (Bacallao Méndez, R. 2015).

La detección de la creatinina en los análisis convencionales esta basada en dos técnicas clásicas; la primera por métodos espectrofotométricos con la reacción de Jeff donde la creatinina forma un complejo con el picrato (Raveendran J., y col., 2017) y la segunda, donde se cuantifica los subproductos en HPLC de una triple reacción enzimática.

Este tipo de procesos requiere gran tiempo de análisis por lo que los sensores se han visto como una alternativa viable, sin embargo, el sensado de creatinina por métodos enzimáticos se ha mostrado con baja estabilidad y gran interferencia, por lo cual se han desarrollado métodos alternos, dentro de los que se encuentra la detección de la creatinina asociado a iones metálicos de transición (Raveendran J., y col., 2017), esto debido a que la molécula presenta varios sitios de unión, dándole la capacidad de coordinar con diferentes grupos donantes (Mitewa, M., 1995)

2.4.1 Molécula de creatinina

La creatinina es un compuesto cíclico con nitrógenos terciarios y un grupo imina (Muralidharan, S. y col. 1984), presenta varias formas tautoméricas en las que se encuentra que el enlace C = N puede ser endocíclico o exocíclico para un anillo de cinco miembros. Las estructuras tautoméricas de enlace C = N endocíclicos se muestran más estables que las que presentan enlaces C = N exocíclicos, siendo la estructura 1 la más probable (Mitewa, M., 1995)

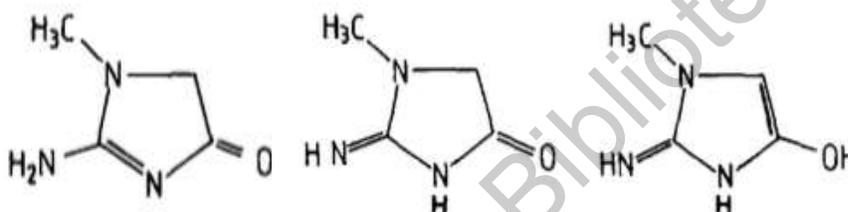


FIGURA 2. Estructuras tautoméricas para la creatinina
(Mitewa, M., 1995)

Se ha demostrado que la creatinina se coordina como un ligando monodentado a través del átomo de N cíclico (Mitewa, M. y col., 1985).

2.4.2 Formación de complejos

Se conoce como complejo a las moléculas o iones que rodean a un ión metálico. Los compuestos que contienen complejos son conocidos como compuestos de coordinación y suelen formarse a partir de metales de transición, aunque no son exclusivos de estos. (Basolo F y col., 1980). Las moléculas que rodean al ión metálico se conocen como agentes ligantes o acomplejantes (Ringbom, A., y Montuenga, C. 1979), las cuales suelen ser aniones o moléculas polares (Basolo F y col., 1980).

Para formar un enlace de coordinación es necesario la donación de un par de electrones del ligando al orbital vacío del ion metálico. Los iones metálicos se

comportan como un ácido de Lewis (dado que acepta los pares electrónicos), mientras que el ligando actúa como base de Lewis (donador de electrones) (Muñoz Botella, S. 2002).

Al formar un complejo, el ligando se coordina con el metal, quedando como centro el metal y los ligandos unidos a él constituyen la esfera de coordinación del complejo. La formación de complejos puede modificar drásticamente las propiedades del ion metálico, como son su capacidad de oxidación o de reducción (Basolo F y col., 1980).

2.4.3 Complejos de creatinina

Las investigaciones sobre la capacidad para acomplejarse de la creatinina con diferentes iones metálicos podrían ser interesantes en relación con los estudios del metabolismo de la creatinina (Mitewa, M. y col., 1985).

Los metales de transición y los óxidos metálicos han recibido gran atención como modificadores de electrodos debido a su capacidad de transferencia de electrones, buena estabilidad y actividad catalítica. Los iones de metales de transición pueden quelatar con creatinina para formar un complejo soluble de creatinina-metal debido a varios grupos donantes en la forma tautomérica principal de creatinina, como Ag (I), Zn (II), Cd (II), Hg (II), Co (II), Cu (II) y Fe (III) (Boobphahom, S., y col., 2019). Udupa y col. estudiaron las propiedades de coordinación de la creatinina con los iones de Zn (II), Cd (II), Hg (II), Co (II) y Ag (I) obteniendo complejos neutros de del tipo Metal-creatinina-X, (X: Cl⁻, Br⁻ o I⁻) en soluciones metanólicas.

Por otro lado, metales como el hierro y el cobre se han mostrado como agentes oxidativos mimetizando procesos enzimáticos. La taza oxidativa que presentan

estos elementos está relacionada con la estabilidad de los complejos metálicos (Puglia, M., y col., 2000).

2.4.4 Complejos cobre-creatinina

El complejo de cobre-creatinina ha sido el preferido sobre otros metales debido a que el cobre es un oligoelemento esencial que está presente en el cuerpo humano y ayuda al funcionamiento adecuado de los procesos metabólicos y a mantener los órganos sanos, además de que el complejo que se forma con cobre es más soluble en agua comparado con otros complejos metálicos de bloque d (Gangopadhyay, D. y col., 2016).

Mitewa y col. en el 91 demostraron la formación de un complejo de cobre creatinina en una solución acuosa, con una relación de metal-ligando 1:2. De igual forma también se estudió la capacidad quelante del CuO con creatinina para la formación de un complejo soluble, el cual fue estudiado mediante técnicas amperométricas, dando respuesta con una corriente oxidativa. Por lo tanto, CuO es un material prometedor para la detección de creatinina (Boobphahom, S., y col., 2019).

2.5. Sensor de Urea

La mayoría de los métodos para determinar urea están basados en la hidrólisis de la urea por medio de la ureasa y la cuantificación de los iones producidos por esta. El transductor puede ser amperométrico, potenciométrico o conductimétrico y a pesar de que los sensores amperométricos muestran mayor sensibilidad y menor límite de detección, se usan sensores potenciométricos para disminuir la interferencia de las muestras reales encontradas en las mediciones amperométricas (Pizzariello, A y col., 2001).

La sensibilidad y selectividad del sensor de urea está estrechamente relacionado con la inmovilización y el soporte de esta. Para ello se ha trabajado con electrodos modificados con polímeros conductores e inmovilizaciones en electrodos compuestos (Luo, Y. C. & Do, J. S., 2004).

Dentro de los soportes utilizados se encuentran los materiales nanoestructurados los cuales han conducido a técnicas de inmovilización adecuadas para anclar la enzima con la preservación de la actividad biológica. Los electrodos desarrollados con enzima/nanomateriales deben su éxito a la transferencia de cargas entre la enzima y el electrodo, la cual puede optimizarse con nanopartículas metálicas (Crespilho, F. y col., 2009).

2.5.1 Polímeros Conductores

El uso de películas poliméricas como soporte para la inmovilización de enzimas son consideradas altamente efectivas debido a que presentan una transferencia directa de los electros entre la enzima y el polímero (Kuralay, F. y col., 2006), además de tener una alta estabilidad química y electroquímica dando como resultado un material con alto potencial de detección (Singh, M. y col., 2008).

Los polímeros conductores han sido ampliamente utilizados para la elaboración de biosensores, en algunos casos los polímeros son dopados o modificados, con el fin de catalizar reacciones y mejorar las características del sensor. La sensibilidad y la selectividad de los biosensores basados en polímeros conductores se determinan principalmente por la diferencia en las propiedades específicas antes y después de la exposición a una molécula objetivo de prueba (Ates, M. 2013). En la Tabla 7 se muestran los polímeros más utilizados para la elaboración de biosensores.

TABLA 7. Polímeros conductores utilizados para el desarrollo de biosensores (Ates, M. 2013).

Polímero	Características
Polipirrol (PPY)	Poseen excelentes propiedades electrónicas y ópticas, se deposita fácilmente en soluciones acuosas con un pH neutro, además tiene una alta estabilidad térmica y a las condiciones ambientales. Es un polímero biocompatible y biodegradable
Politiofeno (PTh)	Es de los materiales mas estables en condiciones ambientales. El proceso de electropolimerización es sencillo y rápido, además tambien puede ser usado como sustrato activo para sistemas de transducción de hibridación.
Poly (3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT)	Presenta alta reactividad y sensibilidad a la oxidaciones de moléculas orgánicas, además de permitir detecciones simultaneas.
Polianilina (PANI)	Se puede realizar una electropolimerización utilizando diferentes tipos de ácidos, y las propiedades de la película dependen de la naturaleza de los agentes dopantes del polímero. La detección de amoniaco con películas de PANI presenta alta sensibilidad, respuesta reversible y de corto tiempo.
Polifenol	Se ha utilizado para el desarrollo de sensores amperométricos y en detecciones <i>in situ</i> , debido a que presentan una alta sensibilidad, simplicidad y fácil miniaturización. Se han realizado electrodos

	<p>modificados con nano partículas de cobre (CuNP), quitosano (CHIT) y con nanotubos de carbón de pared múltiple (cMWCNT) con buenas respuestas a la detecciones de moléculas orgánicas.</p>
<p>Poliacetileno (PA)</p>	<p>Presenta una fuerte resistencia a la descomposición térmica, también se han logrado obtener películas disustituidas con grupos funcionales como las piridinas, aminas e índoles.</p> <p>Es un polímero altamente utilizado como soporte para la inmovilización de aminas.</p>
<p>Polifurano</p>	<p>Se ha utilizado para el desarrollo de sensores opticoelectrónicos, debido que al doparse presenta un cambio en su color, sin embargo, es muy sensible a la humedad por lo que su resistividad eléctrica baja considerablemente.</p>

2.5.1.1 Polianilina en el sensado selectivo de Urea

Las enzimas son biocatalizadores que se usan en el desarrollo de biosensores, y a menudo se depositan sobre películas de polímeros conductores como soporte para la inmovilización de bio-moléculas en el electrodo. Los polímeros conductores como la polianilina pueden aplicarse como mediadores en biosensores (Meibodi, A. S. E., & Haghjoo, S. 2014).

La polianilina es el de gran importancia debido a su estabilidad en condiciones ambientales, puede obtenerse fácilmente mediante la polimerización oxidativa y debido a su solubilidad en compuestos orgánicos, pueden obtenerse películas independientes, estables y flexibles. Al poseer todas estas propiedades, la

polianilina cumple con las características de un agente inmovilizador (Laska, J. y col., 1999).

Por otra parte, la detección de la urea se obtiene a partir del hidrolisis de dicha molécula, obteniendo dos productos, entre estos el ion amonio (como se ha mencionado anteriormente) el cual puede unirse de forma covalente a las películas de polímeros conductores, siempre que estas posean un grupo funcional con una carga negativa, como se muestra en la figura 3 (Luo, Y. C., & Do, J. S. 2004).

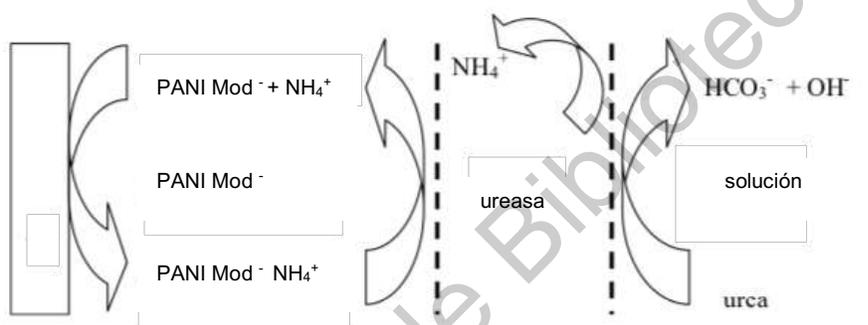


FIGURA 3. Mecanismo general de detección de iones amonio con películas de PANI (Luo, Y. C., & Do, J. S. 2004)

2.6.1.2 PANI modificado

Se ha comprobado que la polianilina puede modificar sus propiedades, mezclándola con polímeros (Laska, J. y col., 1999). o dopándola con materiales aniónicos (Bartlett, P. N., & Wallace, E. N. K. 2001), (Wei, D., & Ivaska, A. 2006).

También se ha modificado la polianilina con materiales nanoestructurados, los cuales se han combinado con enzimas. Este tipo de modificaciones se han realizado para desarrollar electrodos híbridos, los cuales presentan una mejora en el transporte de carga y preservan la actividad biológica utilizada (Crespihlo, F. y col., 2009). Dentro de estos sistemas híbridos, se han usado nanotubos de carbono, los cuales han mejorado la actividad catalítica de las enzimas (Granot, E. y col., 2006).

La figura 4 muestra el esquema de la unión de películas de PANI unidas a los NTC.

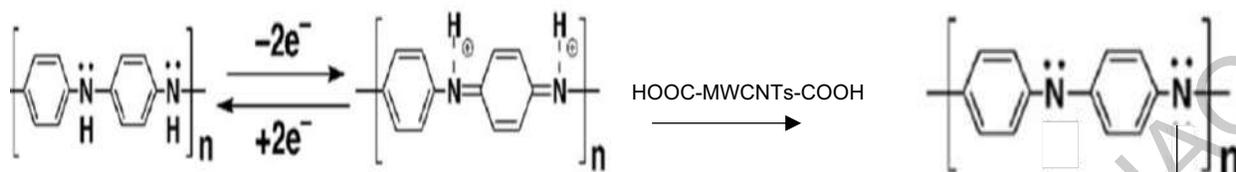


FIGURA 4. Enlace de nanotubos de carbono sobre películas de PANI

(Granot, E. y col., 2006).

2.5.2 Funcionalización de Nanotubos de Carbón Multipared (NTC)

Los nanotubos de carbono son alótopos del carbono con morfología tubular hueca y su amplio uso se debe a la alta estabilidad térmica, buena conductividad y alta resistencia mecánica, sin embargo, tienen poca solubilidad debido a las fuerzas intermoleculares intrínsecas que actúan sobre su superficie. La solubilidad de los nanotubos se puede mejorar modificando su superficie con grupos funcionales como -COOH y -OH. La formación de estos grupos funcionales proporciona una carga negativa que conduce a la repulsión entre los NTC y los ayuda a ser dispersado, además de proporcionar una mejor unión con otros materiales (Stango, S. A. X., & Vijayalakshmi, U. 2019).

La obtención de grupos -COOH en los nanotubos es factible mediante un ataque ácido durante un tiempo de 4 hrs.



Los grupos carboxilos presentes en los NTC pueden modificarse para crear un grupo ester activo, que permite ensamblar grupos amino de compuestos biológicos,

esto se puede lograr con agentes de acoplamiento solubles en agua como lo son EDC / N-hidroxisúamida (NHS) (Qin X. y col., 2010).

El proceso completo de la funcionalización y modificación de los grupos funcionales puede observarse en la figura 5 (Dagar, K., & Pundir, C. S. 2017).

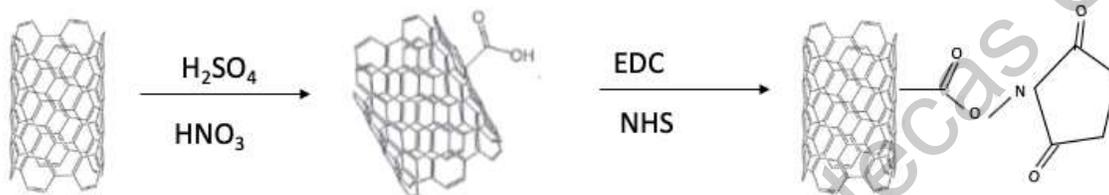


FIGURA 5. Funcionalización de NTC (Dagar, K., & Pundir, C. S. 2017).

2.5.3 Métodos de Inmovilización

De acuerdo con con Sassolas, Blum & Leca-Bouvier (2012), existen 5 métodos básicos para la inmovilización de enzima los cuales son:

Adsorción. Es un proceso simple, con pérdida limitada de su acción enzimática, sin embargo no hay una adsorción específica y presenta desorción.

Enlace covalente. Es un proceso estable, con una respuesta en corto tiempo, alta pérdida de actividad enzimática, no hay una barrera de difusión, su matriz no es regenerable, pero puede enlazarse con productos tóxicos.

Atrapamiento. Se incorpora a la enzima con un gel o un polímero y un mismo polímero puede inmovilizar varias enzimas, también puede presentar una barrera difusa y no hay una reacción entre los monómeros y las enzimas que podrían afectar la actividad enzimática

Reticulado. Procesos simples donde se enlazan las enzimas con una molécula inerte y hay una alta pérdida en la actividad enzimática.

Afinidad. Para este proceso se necesita de la presencia de grupos específicos en la enzima, pero la inmovilización puede ser controlada y orientada. Podemos observar de forma gráfica el comportamiento de las diferentes inmovilizaciones en la figura 6.

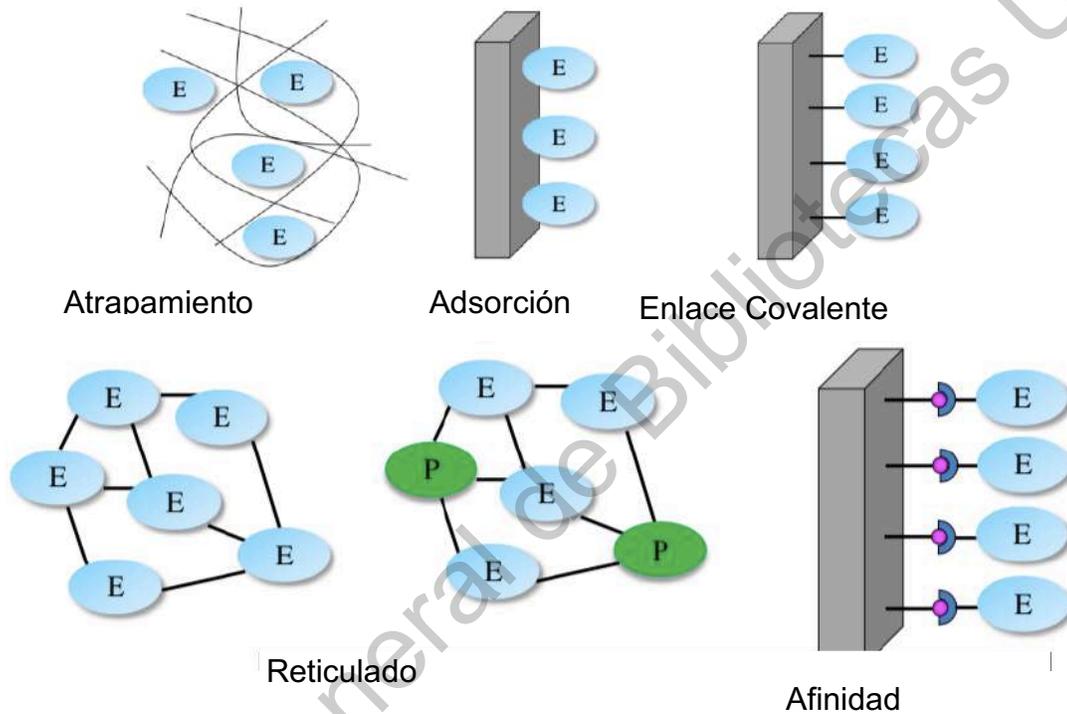


FIGURA 6. Representación de los diferentes métodos de inmovilización

(Sassolas, Blum & Leca-Bouvier, 2012).

La elección del método de inmovilización va a depender de la naturaleza del elemento biológico, el tipo de transductor, las propiedades fisicoquímicas del analito y las condiciones de funcionamiento del biosensor, por lo cual es importante conocer algunas de las ventajas y desventajas de los métodos de inmovilización como se presentan en la tabla 8 (Singh, M. y col., 2008).

TABLA 8. Ventajas y desventajas de los métodos de inmovilización (Singh, M. y col., 2008).

Método	Ventajas	Desventajas
	No existe una modificación química directa	Aplicable solo en analitos pequeños.
Atrapamiento	Presenta especificidad de la interacción del biocatalizador y analito	Alta barrera de difusión de transporte Perdida del biocatalizador
Enlace covalente	Baja resistencia de difusión Fuerte unión entre matriz y biocatalizador Tolerancia a los cambios de pH	Contiene químicos tóxicos Matriz no regenerable Frecuentemente puede existir una pérdida de la actividad del biocomponente
Reticulado	Reduce la pérdida de actividad del biocomponente	Contiene químicos tóxicos
Adsorción	No se presenta modificación del biocomponente La matriz puede regenerarse Gran actividad del biocomponente	Enlaces débiles Susceptible a cambios de pH y temperatura

Hipótesis

El desarrollo de un microdispositivo multiparamétrico formado por un electrodo modificado con materiales nanoestructurados permite incrementar la sensibilidad y amplificar la señal de detección de urea y creatinina en fluidos biológicos de baja concentración, debido a que presentan mayor transferencia de electrones, mejorando la capacidad analítica de los electrodos.

Objetivo General

Desarrollar electrodos para creatinina y urea, selectivos y con alta sensibilidad que cuantifique las concentraciones de creatinina y urea presentes en fluidos simulados de saliva

Objetivos específicos

1. Inmovilizar la enzima ureasa por unión covalente en el electrodo de anilina con nanotubos de carbón, para la detección de urea.
2. Elaborar el electrodo no enzimático basado en un material de CuAg sintetizado por reducción química, para detección de creatinina.
3. Caracterizar a los electrodos modificados por las técnicas electroquímicas de voltamperometría cíclica, voltamperometria de pulso diferencial, cronoamperometría y cronopotenciometria.
4. Caracterizar los electrodos modificados mediante Difracción de Rayos X (XRD), Microscopia electrónica de Barrido (SEM) y Fluorescencia de Rayos X (XRF).
5. Obtener límites de detección y sensibilidad de creatinina y urea en fluidos simulados de saliva.

3. Metodología

3.1. Sensor de creatinina

3.1.1 Síntesis del material CuAg

Se montó un sistema de recirculación a 10 °C un matraz de 3 bocas, en el cual se adicionaron 25 mL una solución 20 mM de NaCl en etilenglicol (EG). Se llevó a calentamiento hasta los 160°C y se agregó gota a gota 2.3 mL de nitrato de plata 0.1 M en EG.

Se adicionaron de forma simultánea 20 mL de 2 soluciones a una velocidad 0.3 mL por minuto con ayuda de una bomba de jeringa de 2 canales. El contenido de las soluciones se muestra en la tabla 9. La síntesis permaneció en agitación durante 12 horas y posteriormente se realizaron 5 lavados con acetona, isopropanol y agua, se filtró y dejó secar.

TABLA 9. Soluciones para síntesis del material CuAg

Solución 1	Solución 2
20 mL E.G	20 mL E.G
339 mg AgNO ₃	30 mg CuSO ₄
	1.136 g PVP

PVP = Polivinilpirrolidona

3.1.2 Caracterización del material CuAg

La morfología del material se obtuvo mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido en un microscopio JEOL- JSM-7401F, además las nanopartículas se caracterizaron por medio de difracción de rayos X (XRD) en un difractómetro bruker D8 advance, y la composición del material CuAg se determinó mediante espectroscopia de fluorescencia de rayos X (XRF).

3.1.3 Elaboración del electrodo CuAg

Se elaboró una tinta catalítica del material sintetizado CuAg y carbón Vulcan en una proporción 20-80 respectivamente, la cual fue dispersada en alcohol isopropílico y nafion. La mezcla se sonicó durante 15 minutos y posteriormente fue resuspendida 5 minutos en vortex. La composición de la tinta se muestra en la tabla 10.

TABLA 10. Composición de tinta catalítica

CuAg	Carbón Vulcan	Alcohol isopropílico	Nafion
20%	80%	120 μL^*	14 μL^*

* Volumen por miligramo de material total.

Para las pruebas electroquímicas se depositaron 2 μL de la tinta catalítica en un electrodo de carbón vítreo que se utilizó como electrodo de trabajo. Se realizaron voltamperometrias cíclicas con una ventana de -0.3 a 0.6 V contra un electrodo de referencia de Ag/AgCl 0.3M de KCl a una velocidad de barrido de 20 mVs⁻¹ en un potenciostato Biologic VSP/galvanostato, para obtener el potencial de oxidación de la solución de creatinina.

3.1.4 Cuantificación de creatinina

Para la detección de la creatinina se utilizó la técnica de Voltamperometría de Pulso Diferencial (DPV). Se realizó una curva de calibración en soluciones de creatinina de 30 hasta 300mM aforadas en buffer de fosfatos pH 7. Cada medición se realizó por triplicado, para obtener el error estadístico.

Para obtener la sensibilidad del método se calcularon los límites de detección (LDD) y de cuantificación (LDC) con las siguientes formulas en la Ec (1) (Quino, I., Ramos, O., y Guisbert, E., 2007), (Thomsen, V y col., 2003).

$$LDD = \frac{3 * sb}{m} \quad LDC = \frac{10 * sb}{m} \quad (1)$$

Donde:

sb = la desviación estándar del blanco

m = pendiente de la ecuación de la recta

3.1.5 Pruebas de interferencia

La selectividad del método se probó frente a sustancias consideradas como posibles interferencias. Una solución de creatinina se enriqueció con glucosa, ácido úrico, ácido ascórbico y urea en una concentración de 100 µM. Se realizó por triplicado una Voltamperometria Ciclica con una ventana de -0.3 a 0.6 V contra un electrodo de referencia de Ag/AgCl 0.3M de KCl a una velocidad de barrido de 20 mVs⁻¹

3.2 Sensor de Urea

3.2.1 Funcionalización de los nanotubos de carbon multipared

Los nanotubos de carbono multipared (NTC) fueron funcionalizados durante 6 horas con un ataque ácido de $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{SO}_4$ en proporción de 3:1 v/v en baño ultrasonico. Los NTC fueron lavados con agua desionizada hasta obtener un pH neutro y secados durante 5 horas a 80°C .

Posteriormente 4 mg de los NTC secos fueron sonicados durante 1 hora junto con 10 mL de buffer MES comercial 500mM, 3.2 mL de N-hidroxisuamida 500 mM y 1.3 mL de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) 70 mM. Los nanotubos fueron lavados 3 veces con solución MES 500 mM.

3.2.2 Elaboración del electrodo PANI/NTC

Sé realizó una electropolimerización sobre electrodos de papel toray con anilina 0.1 M aforada en H_2SO_4 0.5 M, a dicha solución se le suspendieron 1mgmL^{-1} de NTC, los cuales fueron proporcionados por el Centro de Investigación en Materiales Avanzados (Cimav) y se llevó a baño ultrasonico por una hora.

La solución de anilina/NTC se colocó en una celda con un electrodo de referencia de Ag/AgCl 3M KCl y un contra electrodo de grafito. La polimerización del electrodo fue realizada en 10 ciclos con una velocidad de barrido de 50mVs^{-1} y una ventana de -0.5 a 0.8 V (Guerra-Balcázar, M. y col., 2010, y Meibodi, A. S. E., y Haghjoo, S. 2014). Al finalizar la voltamperometria se obtiene el electrodo de PANI/NTC

3.2.3 Inmovilización de ureasa

La inmovilización de la enzima se realizó sumergiendo durante 90 minutos en una solución 1 mg mL^{-1} de ureasa un electrodo de papel toray polimerizado con nanotubos de carbón multipared (electrodo PANI/NTC) para obtener la formación del electrodo de PANI/NTC/Urs

3.2.4 Caracterización del electrodo

Evaluación del efecto del pH y la temperatura. Para encontrar los parámetros óptimos del electrodo se realizó una prueba para evaluar el efecto del pH de la enzima inmovilizado sobre el electrodo de PANI/NTC, en la cual se usaron soluciones de urea en diferentes buffer de fosfatos (K_2HPO_4 y KH_2PO_4 0.1M) en los rangos de pH de 4.5 – 8 a $25\text{ }^\circ\text{C}$. Se adicionó $50\mu\text{L}$ de ureasa 1 mg mL^{-1} y se dejó reaccionar por 20 minutos, posteriormente se agregó 0.5mL de reactivo Nessler Sigma-Aldrich y se midió en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 380 nm. La temperatura óptima fue evaluada con el mismo procedimiento, modificando los parámetros de temperatura de $15\text{-}65\text{ }^\circ\text{C}$, en soluciones de urea con el pH óptimo encontrado.

Determinación de proteína. La evaluación de la proteína se realizó durante un periodo de 5 horas donde se extrajo cada 30 minutos $50\ \mu\text{L}$ de una solución de ureasa 1 mg mL^{-1} en la cual se encontraba el electrodo de PANI/NTC sumergido. El sobrenadante se depositó en tubos que contenían 2.5 mL de reactivo C (2% Na_2CO_3 , 1% CuSO_4 y 2% Tartrato de potasio), 0.5mL de H_2O y 1mL del reactivo Follin Sigma-Aldrich (diluido 1:4) y se midieron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 580 nm.

Morfología de la superficie del electrodo. La morfología del material se obtuvo mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido en un microscopio JEOL-JSM-7401F en papel toray con PANI, PANI/NTC y PANI/NTC/Urs.

Evaluación electroquímica. La respuesta electroquímica del electrodo PANI/NTC/Urs, se realizó con una voltamperometría cíclica en una solución de urea 1mM y buffer de fosfato pH 7 para encontrar el potencial de oxidación, con una ventana de -0.3 – 0.6 V contra un electrodo de referencia de Ag/AgCl 3M KCl.

3.2.4 Cuantificación de la urea

La detección de la urea se realizó de forma indirecta, cuantificando la producción de NH_3 producido por la hidrólisis de la urea. Se utilizó la técnica electroquímica cronoamperométrica a un potencial de 0.3 V y se realizó una curva de calibración en soluciones de urea de 5×10^{-4} M hasta 2×10^{-3} M aforadas en buffer de fosfatos pH 7. El LDD y LDC se calcularon como se mostró anteriormente en la Ec (1).

3.2.5 Pruebas de interferencia

Se realizaron pruebas de selectividad en solución de urea enriquecida CaCl_2 , NaCl y KCl 1:1 con urea respectivamente a una concentración de 0.1M. Se realizaron pruebas por triplicado de una Voltamperometría Cíclica con ventana de -0.5 a 0.8V contra un electrodo de referencia de Ag/AgCl 0.3M de KCl a una velocidad de barrido de 20 mVs^{-1}

3.3 Pruebas en fluidos simulados de saliva

Las pruebas de cuantificación de urea y creatinina se repitieron modificando la solución buffer pH 7, por saliva artificial reportada por Mutlu y Oktay en el 2013 cuya concentración se presenta en la tabla 11.

Las concentraciones de creatinina evaluados fueron de 30 a 300 μM , mientras que las concentraciones de urea fueron de 5×10^{-4} M hasta 2×10^{-3} M.

TABLA 11. Composición de saliva simulada (Mutlu, I., y Oktay, E., 2013).

Compuesto	Concentración (g L⁻¹)
NaCl	0.4
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.79
KCl	0.4
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	0.78
Na ₂ S 9H ₂ O	0.005

Dirección General de Bibliotecas UAQ

4. Resultados

4.2 Caracterización del material CuAg

4.1.1 SEM

Para conocer la morfología del material CuAg, se realizó la Microscopía de Barrido, donde las imágenes obtenidas se muestran en la figura 7, en la cual se puede observar la existencia de diferentes estructuras, así como la variación en los tamaños. La figura 7b, muestra una imagen general del material, en el cual resalta la formación de alambres, mientras que en la imagen 7a, permite concluir que el tamaño de las estructuras semi esféricas tiende a lo 500 nm de longitud aproximadamente, y el radio de los alambres oscila sobre los 200nm.

A pesar de que las dimensiones del material excede el rango nanométrico, la formación de alambres es un buen indicativo; esto a que los alambres tienen la capacidad de amplificar la señal, debido a que existe una correlación entre la amplificación y el portador de carga, además de que los alambres tienen la capacidad de aumentar los límites de linealidad debido al aumentar el área, evita la saturación del analito. La importancia de los alambres, radica en el transporte de la carga, lo que se realiza a lo largo del eje (Fennell Jr. y col., 2016).

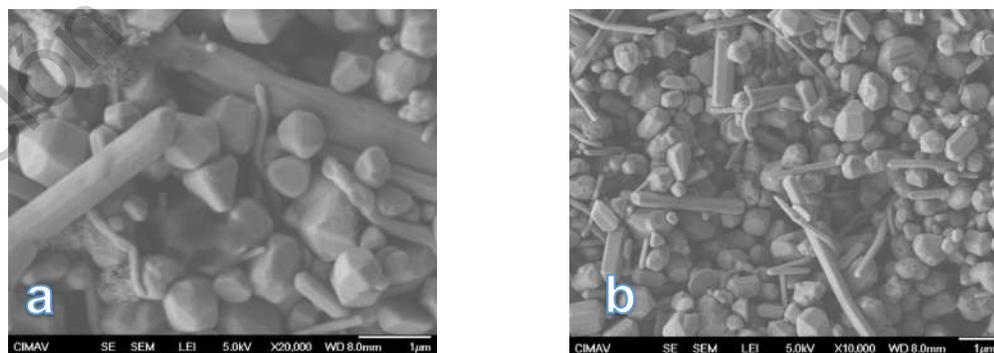


FIGURA 7. Micrografías de SEM obtenida para CuAg

4..1.2 XRF

Para conocer los componentes del material sintetizado, se realizó un análisis de XRF (Fig. 8), en el cual se presentaron las señales de cobre y plata en su mayoría, contra un estándar de hierro. También se obtuvieron los porcentajes en masa de los componentes de la muestra, con el cual podemos confirmar la relación de un 84.62% de plata contra un 15.38% de cobre como se muestra en la tabla 12.

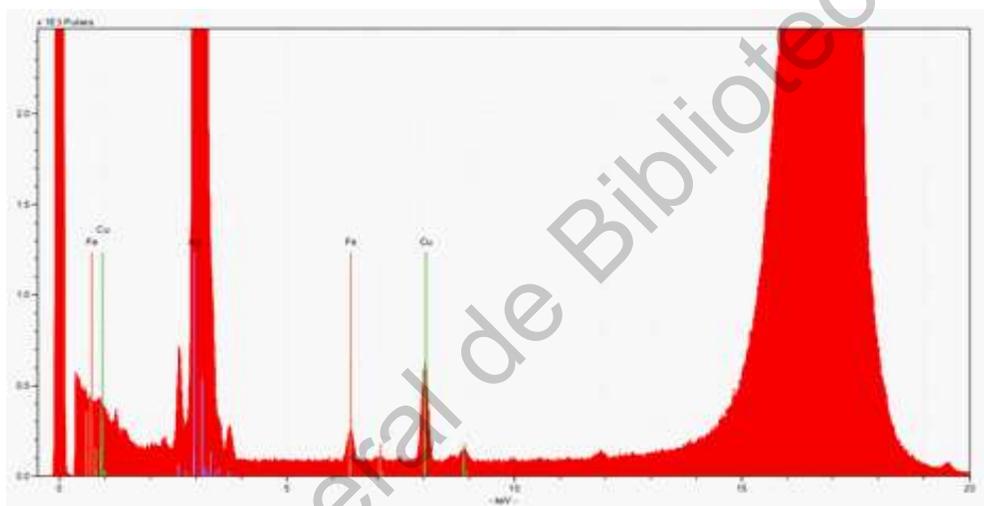


FIGURA 8. Espectro para el material de CuAg obtenido por XRF

TABLA 12. Concentración y porcentaje del material por XRF

Elemento	Concentración (ppm)	%
Plata	1100	84.62
Cobre	200	15.38

4..1.3 XRD

Se obtuvo un patrón de difracción de rayos X para complementar la información obtenida por el XRF con respecto a la composición de la muestra. En la figura 9 se muestran las difracciones de Bragg para el material cristalino, en la cual se pueden observar los planos característicos de la Plata que forma una estructura cubica centrada en las caras con los planos (111) 37.92, (200) 44.04, (222) 64.25 and 77.13 (311) (carta 00-004-0783), además se encuentran las reflexiones de Bragg correspondientes al AgCl (carta 01-070-8903) formada de la mezcla de los reactivos de la síntesis y un compuesto de AgCuO_2 (carta 01-071-5209), los cuales se han identificado con un cuadrado.

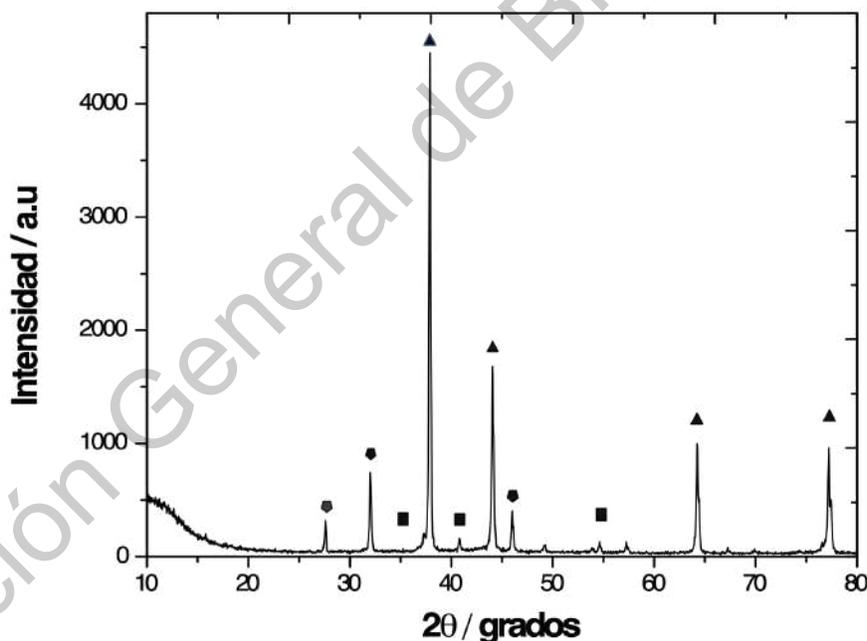


FIGURA 9. Patrón de difracción de CuAg.

▲ Reflexiones de Ag^0 . ♦ Reflexiones de AgCl. ■ Reflexiones de AgCuO_2

TABLA 13. Propiedades cristalográficas del material CuAg

Muestra	% de fase	Parámetro de red (Å)	Tamaño de cristalito (nm)
Ag	54	2.94	62
AgCl	40	3.24	48
AgCuO ₂	6	3.94	32

Con la información arrojada por el análisis de Rayos X se obtuvieron las propiedades cristalográficas del material denominado CuAg (Tabla 13) por el método de Rietveld Refinement. Se calcularon los porcentajes de fase de cada material, en el cual el porcentaje de plata metálica se encuentra de forma mayoritaria.

Debido a que el material sintetizado presenta más de una fase cristalográfica, es importante conocer el tamaño de cristalito de cada una de las fases, ya que la diferencia de tamaños repercute de forma directa en la cristalinidad de la muestra (Sanz Bernabé, Á. 2016).

Los resultados obtenidos nos muestran una alta cristalinidad, lo cual nos da como consecuencia una buena conductividad eléctrica de nuestro material.

Es importante resaltar que el tamaño de cristalito debe ser mayor a 5nm para considerarse cristalino y a mayor tamaño de cristalito, mayor grado de cristalinidad.

4.2 Caracterización electroquímica

Para conocer el comportamiento del electrodo formado por CuAg se realizó una voltamperometría cíclica en presencia y ausencia de creatinina, la figura 10 muestra que existe un crecimiento de la corriente, cuando el electrodo se encuentra en presencia de creatinina.

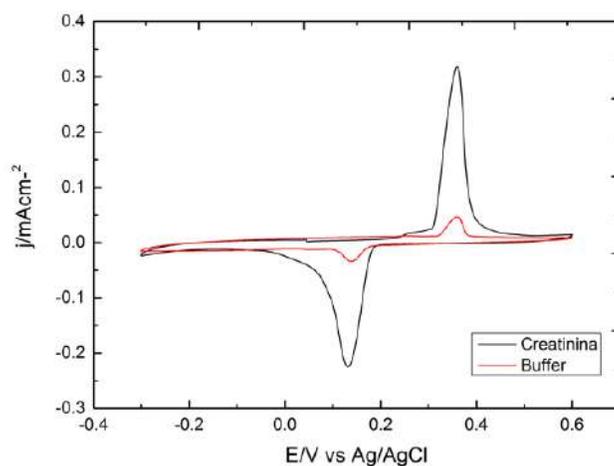


FIGURA 10. Voltamperometría cíclica del electrodo modificado C/CuAg en presencia y ausencia de creatinina en solución buffer de fosfatos pH 7 a 20mVs^{-1}

Para descartar que el crecimiento de los picos oxidativos esta relacionado al comportamiento electroquímico de la voltamperometría, se realizó una prueba de estabilización con una voltamperometría cíclica en solución buffer con 40 ciclos, donde se observa que existe una decremento de la corriente con cada ciclo como se observa en la figura 11.

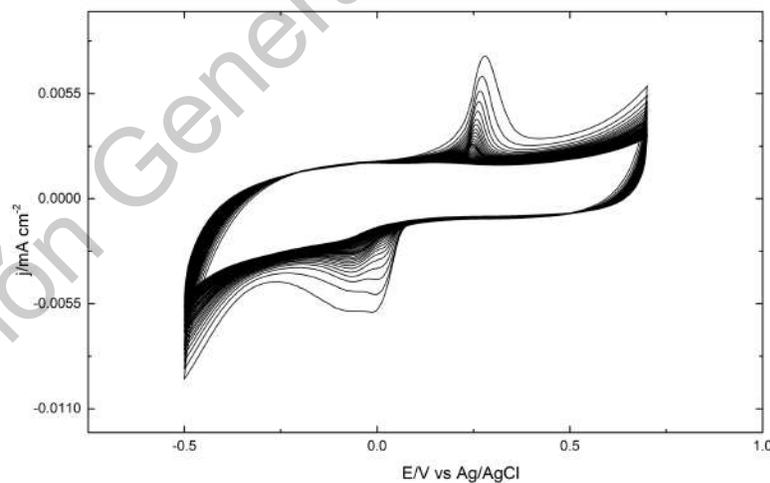


FIGURA 11. Voltamperometría cíclica del electrodo modificado C/CuAg solución buffer de fosfatos pH 7 con 40 ciclos a 20mVs^{-1}

La figura 12 muestra las voltamperometrías cíclicas en presencia y ausencia de creatinina (0 μM - 300 μM), en donde se puede observar un incremento de corriente al incrementar la concentración del analito. Se observa un pico de oxidación en aproximadamente 0.35 V vs. Ag/AgCl, similar a los resultados obtenidos por Raveendran y col. en el 2017. A partir de este experimento es posible comprobar que el material CuAg, es un candidato viable para la detección de creatinina, sin embargo, es necesario conocer si el crecimiento de la corriente tiene un comportamiento lineal.

Para realizar la cuantificación de la creatinina, se realizó una Voltamperometría de Pulso Diferencial (DPV) para soluciones de creatinina de 0 μM - 300 μM con una ventana de potencial de 0 – 0.5V, donde nuevamente la corriente incrementó cuando la concentración de creatinina en el medio aumentaba, tal como muestra la figura 13.

En la tabla 14 se presentan los valores normalizados para las concentraciones de 30 a 300 μM para los DPVs obtenidos, considerando un diámetro del electrodo de 0.3 cm. Los valores reportados en la tabla 14 se utilizaron para el la elaboración de las curva de calibración.

El coeficiente de correlación lineal obtenido de los valores normalizados de las voltamperometrías de pulso diferencial es de 0.993, lo cual nos indica que el método presenta una secuencia lineal y es posible cuantificar concentraciones en muestra problemas. En la figura 14 se muestra la línea de tendencia lineal con un valor de 0.99, así como la ecuación de la recta obtenida.

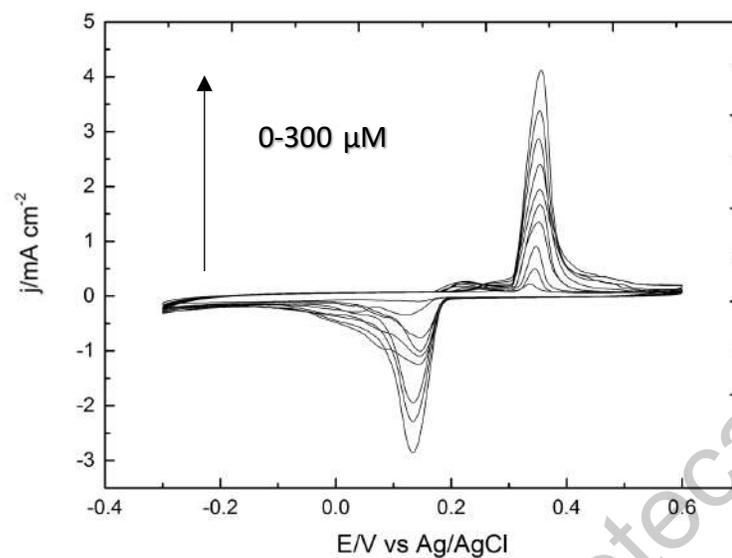


FIGURA 12. Voltamperometría cíclica del electrodo modificado C/CuAg con diferentes concentraciones de creatinina en solución buffer de fosfatos pH 7 a 20mVs-1

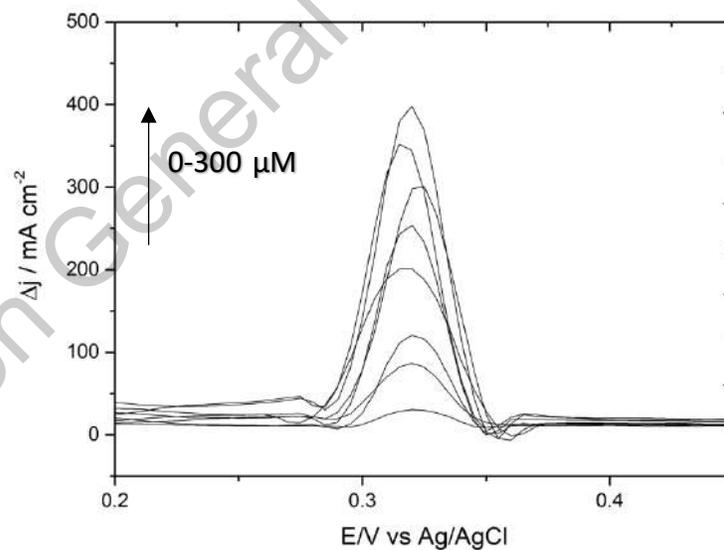


FIGURA 13. Voltamperometría de pulso diferencial C/CuAg con diferentes concentraciones de creatinina en solución buffer de fosfatos pH 7

TABLA 14. Relación de las concentraciones de creatinina y la variación de corriente en mA.

Concentración μM	1	2	3	Promedio	Normalizado
30	1.832	1.564	1.803	1.7334	24.763
60	3.066	3.891	3.544	3.500	50.010
90	6.200	6.431	6.571	6.401	91.448
120	9.265	9.843	8.843	9.317	133.102
150	13.204	13.513	13.413	13.376	191.097
180	16.567	15.849	15.997	16.138	230.546
210	21.028	21.322	22.279	21.543	307.760
240	24.029	24.596	24.792	24.472	349.609
270	27.838	27.523	26.911	27.424	391.777
300	31.169	30.753	31.011	30.978	442.545

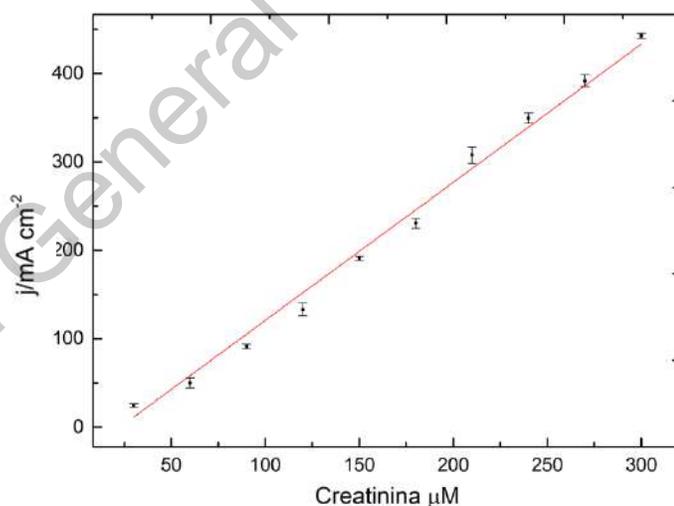


FIGURA 14. Curva de calibración de creatinina.

$$R^2 = 0.9934, y = 1.6175x - 45.622$$

4.2.1 LDD y LDC para creatinina

Las variaciones de corriente del control se muestran en la tabla 15, junto con la desviación estándar. Los valores obtenidos en los límites de detección y cuantificación mostrados en la Ec (2) son un fuerte indicativo de las bajas concentraciones que el material puede detectar y cuantificar, abriendo pauta para la cuantificación en fluidos de baja concentración como la saliva.

TABLA 15. Variaciones de corriente normalizadas y desviación estándar del blanco

Corrientes normalizadas del buffer de fosfato pH 7 (mAcm ⁻²)			Desviación estándar
1	2	3	sb
0.07059	0.05828	0.03438	0.01504

$$LDD = \frac{3 \cdot 0.01504}{1.617} = 0.027 \mu M \qquad LDC = \frac{10 \cdot 0.01504}{1.617} = 0.092 \mu M \qquad (2)$$

En la tabla 16 se presentan los valores reportados en pacientes control y pacientes terminales, considerando los parámetros críticos (LDD y LDC) obtenidos, se puede concluir que el material es funcional para la cuantificación de creatinina debido a que se encuentra por debajo de los parámetros médicos reportados.

TABLA 16. Valores presentes en saliva para pacientes control y terminal.

	Control	Terminal
Saliva	31.19 μM	99.01 μM

Es importante enfatizar que, de acuerdo con los valores previamente reportados (Tabla 16) y a los valores encontrados en este trabajo, tenemos bajo límite de detección y amplio rango de linealidad, superando hasta una tercera parte el rango máximo de pacientes terminales.

Adicionalmente se probó el incremento de la intensidad con respecto al incremento de la concentración con una cronoamperometría, donde se fijó el potencial encontrado de 0.35 V en las voltamperometrías cíclicas y se realizaron adiciones de 5 μL de una solución de creatinina concentrada 0.5mM, obteniendo una respuesta positiva como se muestra en la figura 15.

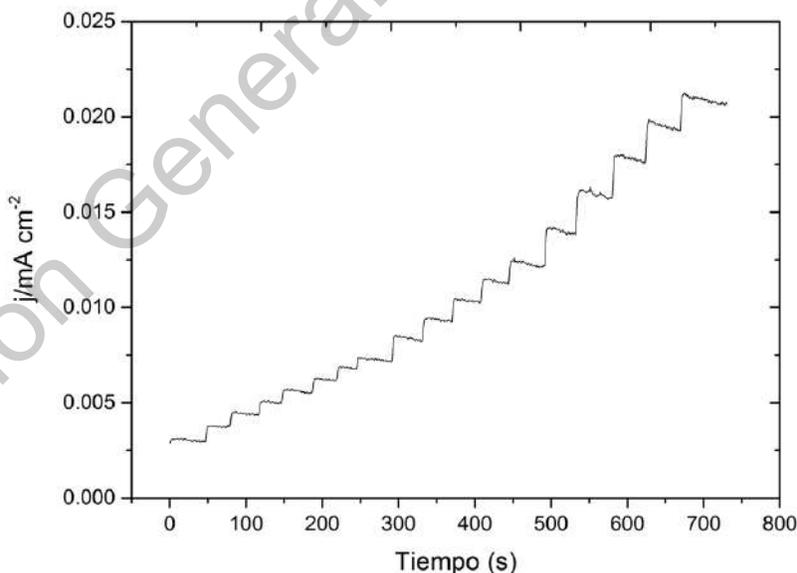


FIGURA 15. Cronoamperometría de creatinina en buffer de fosfatos pH 7.

Para la cronoamperometría se realizaron 5 primeras adiciones de 5 μL de creatinina 0.5mM, posteriormente 5 adiciones de 10 μL y por último 5 adiciones de 15 μL , observando un incremento proporcional y congruente con las adiciones de creatinina.

Se realizó la curva de calibración con los datos arrojados en la cronoamperometría, obteniendo una relación lineal entre ellos con un valor de 0.998. La curva de calibración se muestra en la figura 16.

Las concentraciones analizadas parten desde la ausencia de creatinina hasta una concentración de 325 μM y en todo el espectro se conservó la linealidad, reafirmando los resultados obtenidos con la técnica de voltamperometría de pulso diferencial.

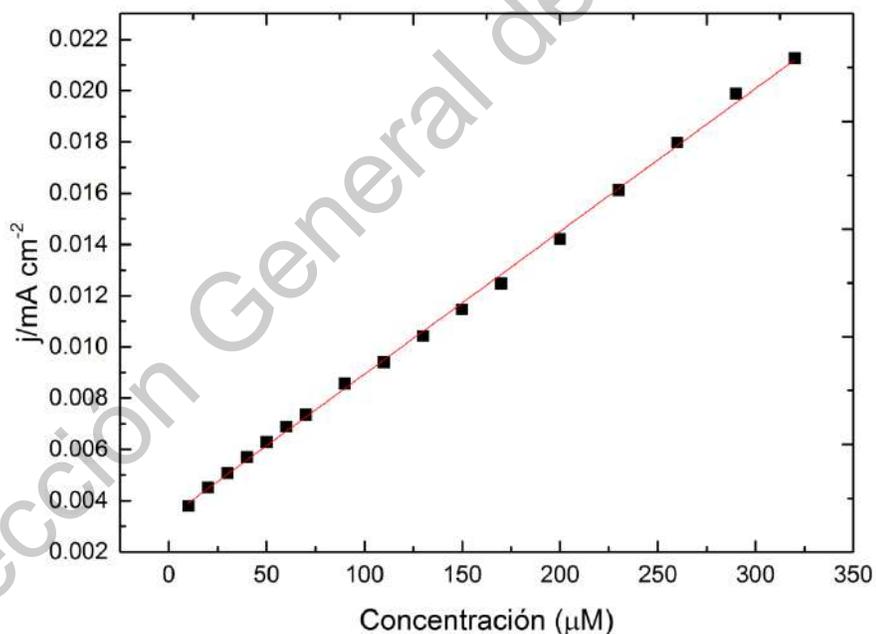


FIGURA 16. Curva de calibración por cronoamperometría en potencial 0.35 V.

$$R^2 = 0.998, y = 5.58 \times 10^{-5}x + 0.0034$$

4.3 Pruebas de interferencia de creatinina

Se realizó una prueba de interferencias con una voltamperometría cíclica en presencia de Ácido ascórbico (AA), Ácido úrico (AU), Glucosa (Glu), Urea (Ur) y Creatinina, en proporciones 1:1 y una concentración de 100 μM para conocer el efecto de cada compuesto sobre la intensidad en la corriente.

En la figura 17 se muestra el comportamiento de cada compuesto orgánico en donde se observa una disminución considerable de corriente de la mezcla de urea y creatinina, además el ácido úrico presentó un segundo pico de oxidación en un potencial muy cercano al de la creatinina.

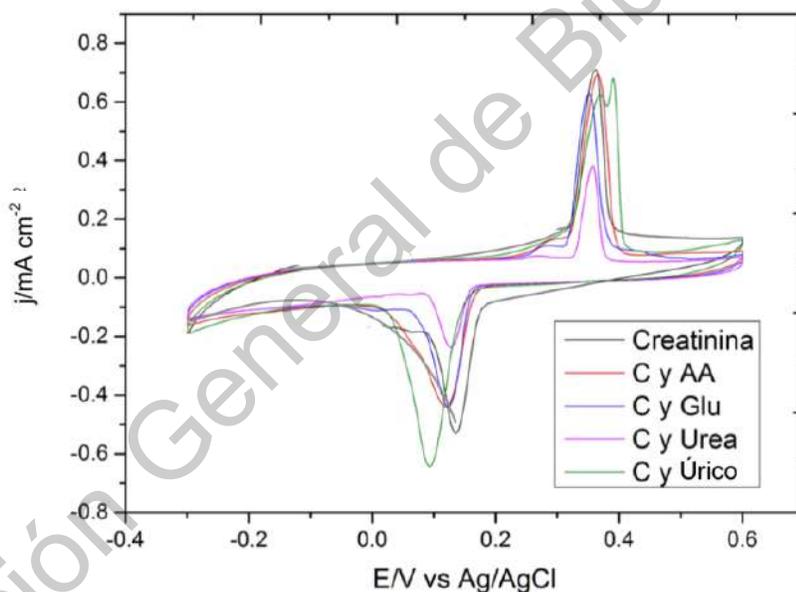


FIGURA 17. Voltamperometría cíclicas de interferentes y Creatinina en buffer de fosfatos a 20mVs^{-1}

Ácido ascórbico (AA), Ácido úrico (AU), Glucosa (Glu), Urea (Ur).

Para conocer si la variación de corriente que se presenta con los diferentes interferentes, existe una diferencia significativa, se realizó una prueba de medias por el método de t de Student (Butler, C. 1985), estableciendo como premisa que todas las corrientes de interferentes son iguales a la corriente de creatinina y como premisa alterna que, por lo menos uno de los tratamientos es diferente.

Para dicho análisis estadístico se utilizó la ecuación 3 y 4.

$$SED = \sqrt{\frac{\sigma_1^2}{N_1} + \frac{\sigma_2^2}{N_2}} \quad (3)$$

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{SED} \quad (4)$$

Donde:

SED = Error estándar entre medias

σ = Varianzas 1 y 2 respectivamente

N = número de datos

t = Prueba t

\bar{x} = Media 1 y 2 respectivamente

El análisis estadístico se realizó al 95% de confianza con dos grados de libertad teniendo una t de tablas de 4.303. Los datos experimentales obtenidos, las medias y varianzas se muestran en la tabla 17.

TABLA 17. Valores de corriente para los interferentes de creatinina en mAcm⁻².

	1	2	3	Media	Varianza
Ácido ascórbico	0.68	0.67	0.66	0.67	6.66 E-05
Ácido úrico	0.64	0.65	0.62	0.64	1.56 E-04
Glucosa	0.61	0.61	0.59	0.60	8.89 E-05
Creatinina	0.6	0.58	0.53	0.57	8.87 E-04
Urea	0.37	0.42	0.33	0.37	1.36 E-03

*Las corrientes reportadas de AA, AU, Glu y Urea se encuentran en presencia de creatinina.

Con los valores reportados en la tabla 17 y las ecuaciones 3 y 4 anteriormente citadas, se obtuvo la prueba de medias, la cual se reporta en la tabla 18.

Considerando el valor t de tablas igual a 4.303, debemos descartar la premisa para las medias de corriente referentes a ácido úrico (en presencia de creatinina) y creatinina sola, así como como para urea (en presencia de creatinina) y creatinina sola.

TABLA 18. Valores de reportados para errores estándar entre medias (SED) y diferencia entre medias (Prueba t).

	SED	Prueba t
AA y Cr	0.017638342	5.6694671**
AU y Cr	0.018459164	3.61157559
Glu y Cr	0.017847087	1.86771842
U y Cr	0.000361296	544.336309**

*Cr = creatinina, ** Diferencia significativa al 95% de confianza

De acuerdo con los resultados obtenidos para el sensor de creatinina se presenta una comparativa con otros trabajos realizados en la tabla 19. En dicho compilado se puede observar electrodos desarrollados en ausencia de enzimas con rangos lineares inferiores a los reportados por este trabajo.

El amplio rango lineal que presentó el electrodo de CuAg se puede deber a la presencia de alambres en el material que nos ayuda a evitar la saturación e incrementar la señal.

Otro factor importante para resaltar es el bajo límite de detección que se presenta, que, a pesar de no ser el menor valor reportado, si se encuentra entre los valores médicos más bajos mencionados.

Dirección General de Bibliotecas UNQ

TABLA 19. SENSORES NO ENZIMÁTICOS REPORTADOS

Electrodo	Método de detección	Límite de detección (μM)	Rango Lineal (μM)	Interferencia	Muestra	Ref
Electrodo de Au modificado con	Impedancia	10	50 -600	No interferencia	Orina	Chen et. Al (2006)
Carbón vítreo modificado con una película de polipirrol	Voltamperometría cíclica	0.005	1-100	-	Suero	Hassan et al. (2005)
Electrodo metálico/ electrodo de ión	Potenciodinámico	-	-	-	-	Kozitsina et al. (2010)
Electrodo de Cu-Pt	Voltamperometría cíclica	0.5	1 - 108	Ácido Úrico	-	Carrera et al. (2005)
Oxido de grafeno reducido/ Ag NPs	Potenciodinámico	0.00000743	0.00010-0.00012	No interferencia	Orina	Sittiwong and Ubob (2015)
Ag/Nps /electrodo modificado con polioxometales	Voltamperometría cíclica	0.00000151	0.000005-0.0015	-	Vino	Zhang et al (2018)
Carbon vítreo con modificado con CuAg	DPV	0.027	0 - 300	Ác. Ascorbico y Urea.	Buffer de fosfatos	Esté trabajo

4.4 Formación del compuesto PANI/MWCNT sobre papel toray

Se depositó una película de PANI en la superficie de un electrodo de papel toray por electrodeposición en presencia de NTCs en suspensión. La formación de la película se observa en la figura 18, donde se presenta el incremento de corriente en cada uno de los ciclos de la voltamperometría cíclica, indicando la formación del polímero sobre la superficie del electrodo.

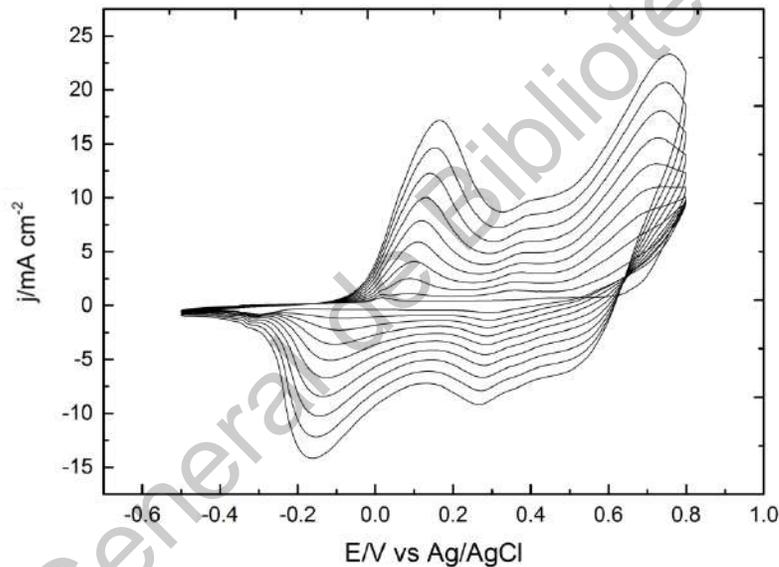


FIGURA 18. Polimerización de anilina/NTC a 20mVs-1 sobre papel toray.

4.5 Morfología del electrodo

Para determinar la morfología de los electrodos en presencia de la polianilina, la modificación con los NTC y el anclaje de la enzima ureasa, se realizó una Microscopia de Barrido la cual se observa en la figura 19.

En estas imágenes se puede apreciar la presencia de la película de la polianilina unida a las fibras del papel toray, también se puede observar el recubrimiento de los nanotubos sobre la polianilina, y en la imagen C, es posible visualizar la presencia de un tercer componente, al que referimos como la enzima.

Las imágenes presentadas en la figura 19 muestran que existe una modificación sobre las superficies del electrodo y revelan la presencia del compuesto electropolimerizado.

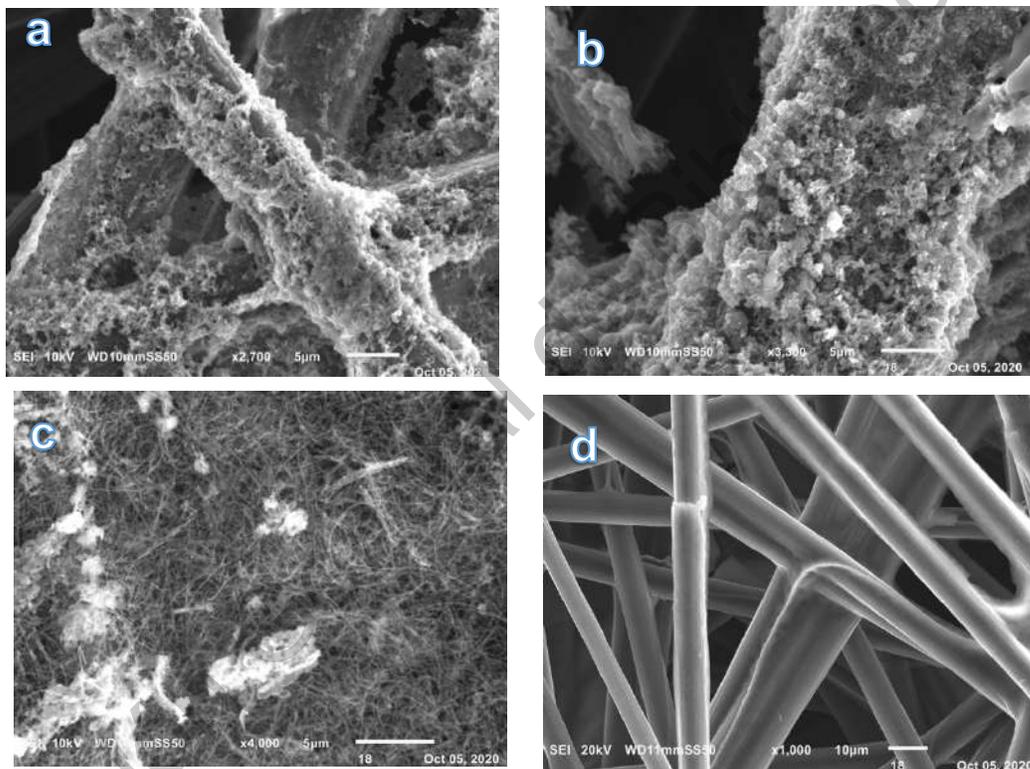


FIGURA 19. Imagen SEM de electrodos

. A) Pani, B) PANI/NTC C) PANI/NTC/Urs D) Papel Toray

4.6 Caracterización del electrodo de Urea

4.6.1 Efecto de la temperatura y pH

Para conocer las condiciones de uso del electrodo, se realizó una caracterización bioquímica para el efecto del pH y del electrodo, tanto para la enzima libre como para la enzima inmovilizada sobre el papel toray, esto con el objetivo de conocer la actividad enzimática, una vez anclada al composito PANI/NTC.

En la figura 20 podemos observar que las condiciones óptimas de trabajo del electrodo PANI/NTC/Urs están determinadas para un pH de 7, a una temperatura de 55°C. Sin embargo, existe un decremento importante en la actividad de la enzima respecto a su temperatura óptima, mientras que el proceso de inmovilización no mostró pérdida significativa en pH neutro.

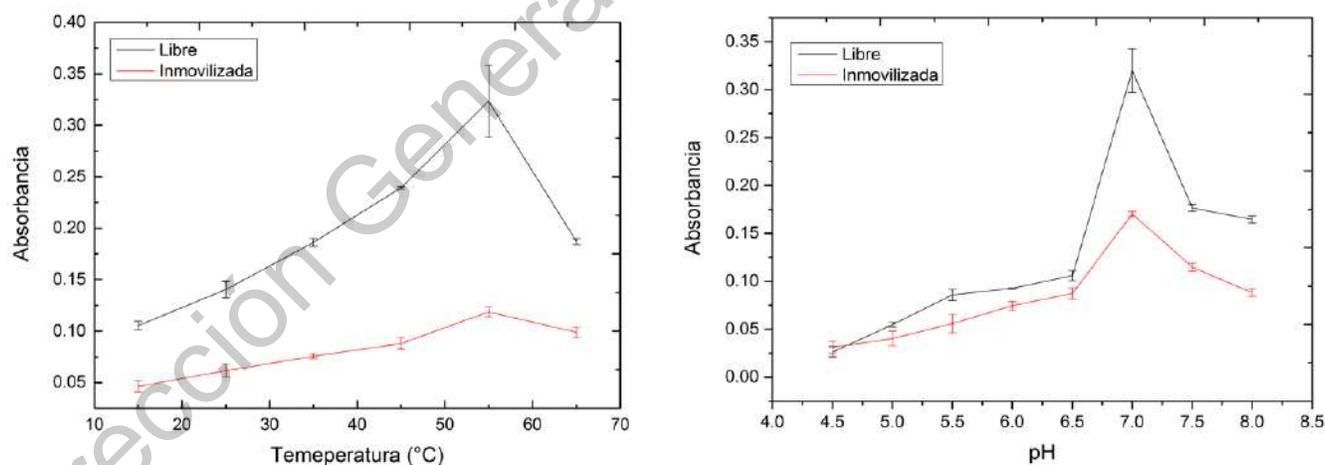


FIGURA 20. Efecto del pH y la temperatura a pH 7 sobre enzima libre e inmovilizada en electrodos de PANI/NTC

4.6.2 Determinación de la proteína

A partir de las condiciones óptimas de trabajo establecidas para el electrodo se realizó una cinética para el anclaje de la proteína sobre el electrodo modificado con PANI/NTC

En la figura 21 se muestra el comportamiento que presentó el anclaje de la enzima, donde el 60% de la proteína esta depositada sobre el electrodo modificado de PANI/NTC en un tiempo de 60 minutos, mientras que a los 90 minutos se refleja a la saturación del electrodo con un porcentaje de anclaje del 80%.

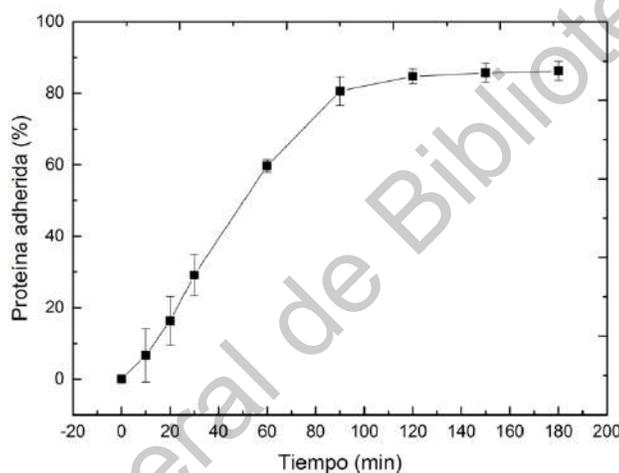


FIGURA 21. Cinética de anclaje de proteína sobre electrodo PANI/NTC/Urs a 55°C

4.6.3 Caracterización electroquímica del electrodo

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido nos mostró la existencia de películas adheridas sobre el papel toray, sin embargo, es importante conocer si existe actividad electroquímica y la diferencia entre cada electrodo.

Se realizaron pruebas de control para conocer el comportamiento del electrodo, por lo cual se realizaron voltamperometrias cíclicas con tres electrodos diferentes; el primero únicamente con una película de PANI, el segundo con el compuesto PANI/NTC y por último, el electrodo de PANI/NTC/urs. En la figura 22 se observa

un perfil diferente para cada uno de los electrodos, observando para el electrodo de PANI un pico en el potencial 0.4, mientras que para el electrodo compuesto por PANI/NTC/Urs se observa el pico en 0.1V.

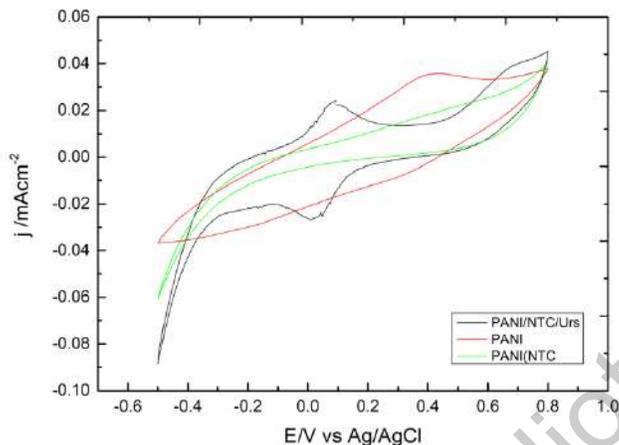


FIGURA 22. Voltamperometría cíclica de los electrodos de PANI, PANI/NTC y PANI/NTC/Urs en buffer pH 7 a 20mVs⁻¹.

Para conocer el comportamiento del electrodo PANI/NTC/urs, se realizó una voltamperometría ciclica en presencia y ausencia de urea, la figura 23 se muestra un comportamiento diferente para cada uno de los perfiles de cada electrodo, donde se alcanza a observar que hay un desplazamiento del potencial hacia la izquierda, cuando el electrodo esta en presencia de urea.

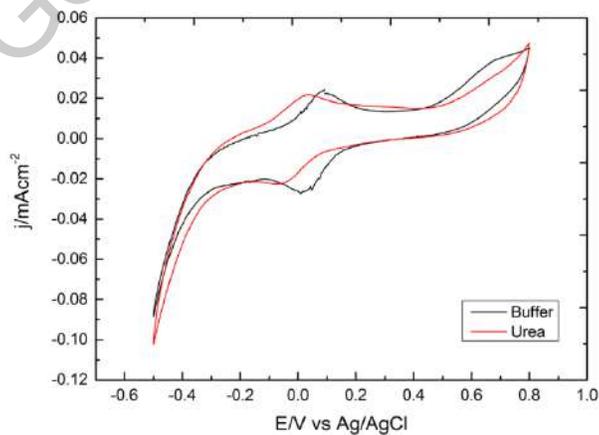


FIGURA 23. Voltamperometría cíclica del electrodo modificado PANI/NTC/Urs en presencia y ausencia de urea a 20mVs⁻¹

4.7 Cuantificación de Urea

La cuantificación de Urea se realizó de forma indirecta a través de la hidrolización por parte de la ureasa para producir el ión NH_3 , que se cuantificó con la película de polianilina. Para la cuantificación se realizó una potenciometría en 20 mL de buffer de fosfatos pH 7, con 10 minutos de estabilización, posteriormente se hicieron 10 adiciones de 5 μL de urea 1M.

En la figura 24 se muestra un decaimiento del potencial con respecto al tiempo al adicionar alicuotas con urea, con una corriente fija de $15\mu\text{A}$. Este decaimiento del potencial esta relacionado al cambio de pH que se observa por la formacion de NH_3 , el cual se produce por la hidrolisación de la urea en presencia de la ureasa, tambieb se puede observar este fenomeno en la voltamperometría ciclíca de la figura 23.

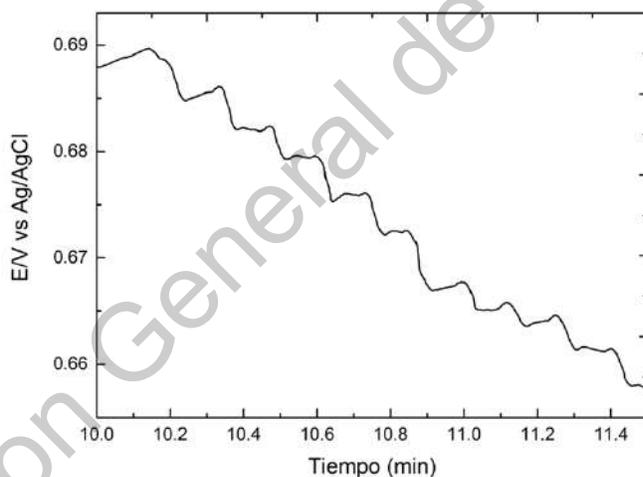


FIGURA 24. Cronopotenciometría de urea en buffer de fosfatos pH 7.

La potenciometría se realizó por triplicado y se obtuvo la curva de calibración que se muestra en la figura 25 con un valor de $R^2 = 0.995$ y una ecuación de la recta de $y = -17.032x + 0.6917$. Los datos obtenidos por el equipo se muestran en la tabla 20.

TABLA 20. Relación de las concentraciones de urea y la variación de potencial en Volts.

Concentración (mM)	1	2	3	Promedio	Error
0	0.6882	0.6891	0.688	0.6884	0.00585
0.2	0.6873	0.6856	0.684	0.6856	0.00165
0.4	0.6845	0.6823	0.6794	0.6820	0.00255
0.6	0.6817	0.6795	0.6752	0.6788	0.00330
0.8	0.6785	0.6757	0.6703	0.6748	0.00416
1.0	0.6727	0.6724	0.668	0.6710	0.00263
1.2	0.6685	0.6672	0.665	0.6669	0.00176
1.4	0.6644	0.6657	0.6621	0.6640	0.00182
1.6	0.6599	0.6638	0.6589	0.6608	0.00258
1.8	0.6575	0.6613	0.6561	0.6583	0.00269
2.0	0.6532	0.6569	0.6512	0.6537	0.00289

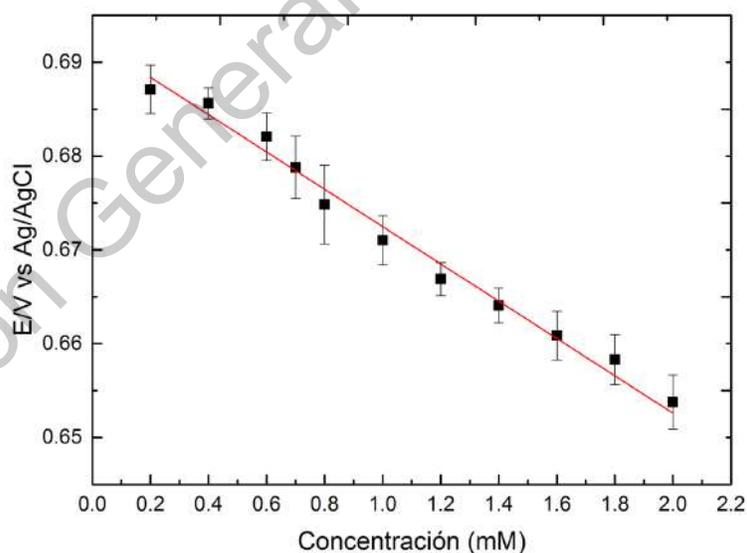


FIGURA 25. Curva de calibración de urea.

$$R^2 = 0.995, y = -17.032x + 0.6917$$

4.8 LDD y LDC para urea

La tabla 21 muestra los valores obtenidos del blanco (concentración 0) así como la desviación estandar correspondiente. Con los valores antes mencionados y las ecuaciones 1 y 2 se pueden obtener los parámetros de cuantificación y detección del electrodo desarrollado.

$$LDD = \frac{3 \cdot 0.00585}{17.032} = 0.00103 \text{ mM}$$

$$LDC = \frac{10 \cdot 0.00585}{17.032} = 0.00344 \text{ mM}$$

Los valores de referencia para pacientes control y terminal se muestran en la tabla 21. Con los valores reportados podemos asegurar que el electrodo tiene la sensibilidad para detectar la presencia de urea en pacientes que presenten Enfermedad Renal Crónica, así como en descartar la presencia de dicha enfermedad.

TABLA 21. Valores de urea en mM reportados para pacientes control y terminal

mM	Control	Terminal
Urea	6.49	7.63

4.9 Pruebas de interferencia para urea

Al realizar una prueba potenciométrica, se realizó una prueba de interferentes con cationes de la misma valencia de NH_4^+ , los cuales fueron K^+ , Na^+ , además de incluir al Ca^{2+} , por estar presente en de forma significativa en la saliva.

En la figura 26 se muestran las voltamperometrias ciclicas de los interferentes de CaCl_2 , NaCl y KCl en presencia de urea, así como la urea sola.

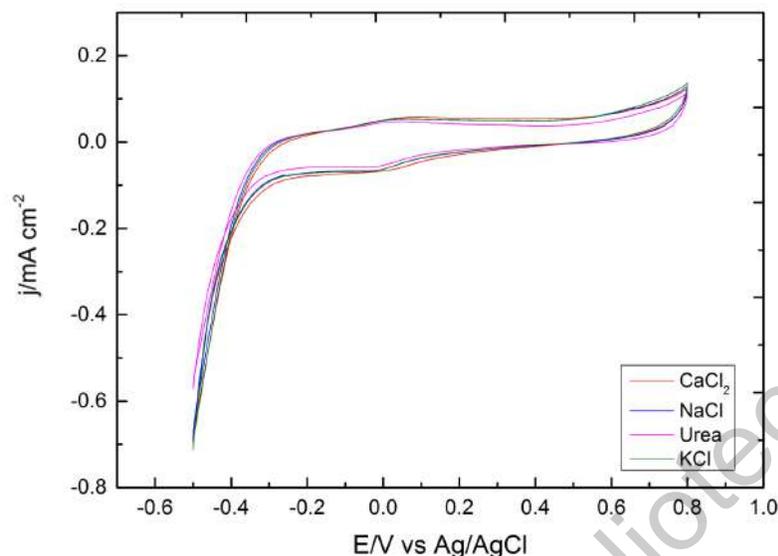


FIGURA 26. Voltamperometría cíclica de urea y CaCl₂, NaCl, KCl en presencia de urea en buffer de fosfatos a 20mVs⁻¹

Para conocer si existen diferencias significativas de la corriente de urea con los interferentes, se realizó una prueba de medias por el método de t de Student, anteriormente reportado. Los valores obtenidos en el potenciostato se reportan en la tabla 22, así como sus promedios y varianzas.

TABLA 22. Valores de corriente para interferentes de urea en mA cm⁻².

Interferente	1	2	3	Promedio	Varianza
Urea	5.84E-03	6.04E-03	5.78E-03	5.89E-03	1.24E-08
KCl	6.67E-03	6.87E-03	6.37E-03	6.64E-03	4.22E-08
CaCl ₂	7.01E-03	6.91E-03	7.20E-03	7.04E-03	1.44E-08
NaCl	6.56E-03	6.36E-03	6.48E-03	6.47E-03	6.76E-09

La prueba t de Studen se realizó al 99% de confianza con un valor de tablas de 9.92 con dos grados de libertad. Se aumenta la rigidez de la prueba debido a los bajos valores obtenidos y los pocos grados de libertad con la finalidad de aumentar la confiabilidad de la prueba.

Los valores obtenidos con la tabla 22 y las ecuaciones 3 y 4 se reportan en la tabla 23, en la cual podemos observar que existe una diferencia significativa en la corriente cuando se encuentra presente el CaCl_2 y urea, comparado contra la corriente de urea sola.

TABLA 23. Valores de reportados para errores estándar entre medias (SED) y diferencia entre medias (Prueba t).

	SED	Prueba t
KCl	0.00013488	5.56
CaCl_2	9.4521E-05	12.2 *
NaCl	7.9815E-05	7.27

*Diferencia significativa al 99% de confianza

4.10 Pruebas en fluidos simulados

4.10.1 Creatinina en Fluido simulado

Para observar el comportamiento del electrodo de CuAg, se realizarón pruebas en un fluido simulado de saliva con pH 7, el cual fue reportado anteriormente en la sección 3.2 de este trabajo y se comparó contra buffer de fosfatos del mismo pH.

La figura 27 muestra las voltampermetrías cíclicas en buffer y fluido simulado, donde se puede observar que hay un barrimiento de potencial en los picos redox, esto

debido a la presencia de las diferentes sales en el fluido simulado de saliva. El desplazamiento fue de 0.35V en buffer, mientras que el potencial en saliva sонтetica fue de 0.05V. También se puede observar un decremento en la corriente en la voltamperometría cíclica del fluido simulado.

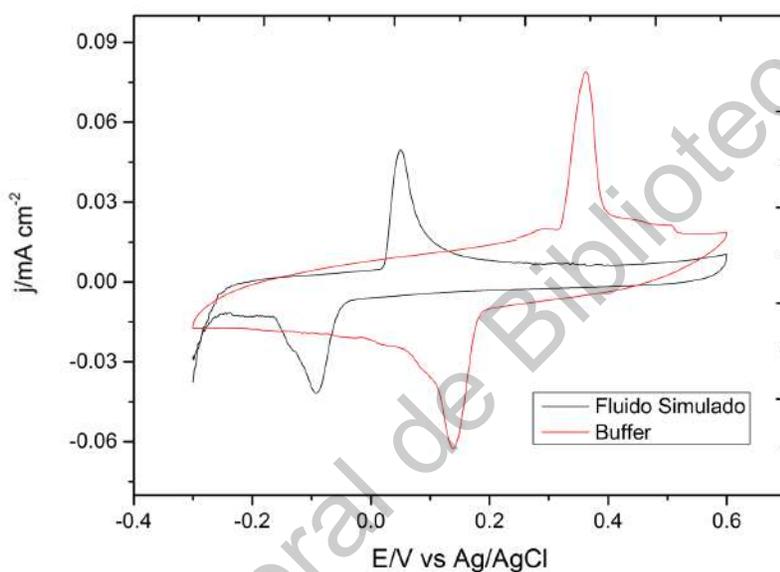


FIGURA 27. Voltamperometría cíclica en buffer de fosfatos y Fluido simulado a 20mVs⁻¹.

En presencia de creatinina el fluido simulado de saliva generó un segundo pico oxidativo en un potencial de 0.35V como se muestra en la figura 28. La presencia del segundo pico se atribuye a un interferente, por lo cual se realizaron pruebas con los cationes presentes en la saliva sintética utilizada.

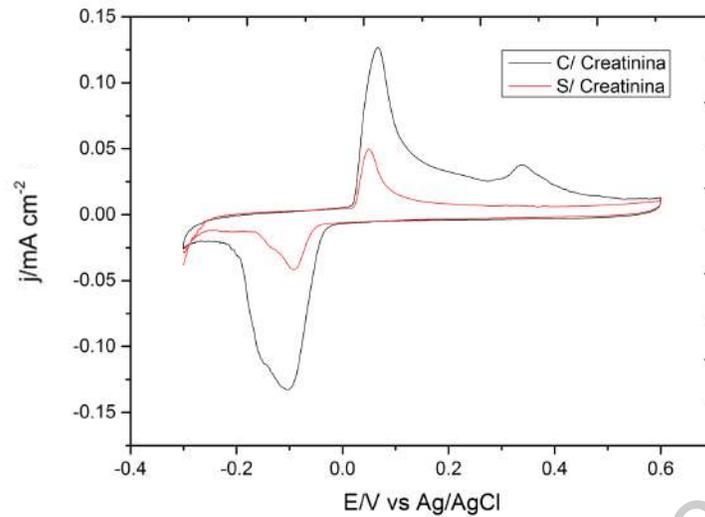


FIGURA 28. Voltamperometría cíclica en Fluido simulado pH 7.0 en presencia y ausencia de creatinina a 20mVs-1.

Para realizar la curva de calibración se realizaron soluciones de 30 μM hasta 300 μM de creatinina en fluido simulado. Se observó crecimiento de la corriente hasta la concentración de 150 μM como muestran las voltamperometrías cíclicas en la figura 29.

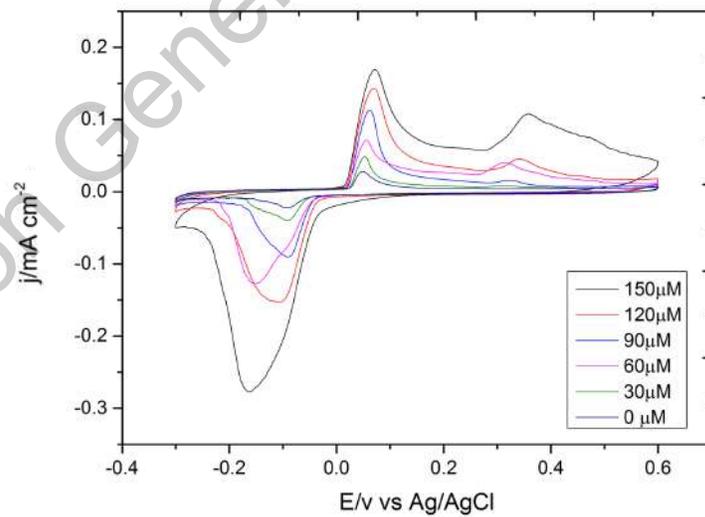


FIGURA 29. Voltamperometría cíclica del electrodo modificado C/CuAg con diferentes concentraciones de creatinina en fluido simulado pH 7 a 20mVs-1

La curva se realizó con Voltamperometrias de Pulso Diferencial (figura 30) con las concentraciones de 0 hasta 150 μM , los datos se reportan en la tabla 24 y la curva de calibración se puede observar en la figura 31 donde se observa un comportamiento lineal con un valor de $R^2 = 0.9898$ y una ecuación de $y = 0.0007x + 0.0011$.

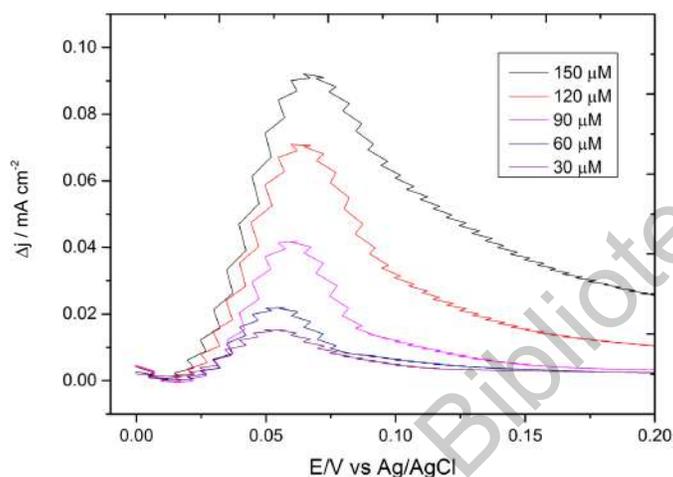


FIGURA 30. Voltamperometría de Pulso Diferencial del electrodo modificado C/CuAg con concentraciones de 30-150 μM de creatinina en fluido simulado pH 7.

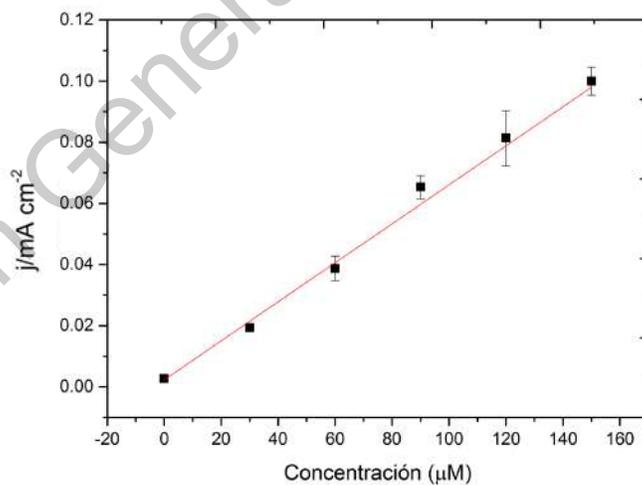


FIGURA 31. Curva de calibración de diferentes concentraciones de creatinina en fluido simulado pH 7.

$$R^2 = 0.9898, y = 0.0007x + 0.0011.$$

TABLA 24. Relación de las concentraciones de creatinina y la variación de corriente en mA cm^{-2} en fluido simulado pH 7.

Concentración (μM)	1	2	3	Promedio	Error
0	0.002	0.003	0.003	0.0027	0.00057735
30	0.02	0.02	0.018	0.0193	0.0011547
60	0.038	0.035	0.043	0.0387	0.00404145
90	0.067	0.061	0.068	0.0653	0.00378594
120	0.087	0.071	0.086	0.0813	0.00896289
150	0.099	0.105	0.096	0.1000	0.00458258

La figura 32 muestra los DPVs realizados en concentraciones de $150\mu\text{M}$ hasta $300\mu\text{M}$, donde se observa que ya no hay un incremento de la corriente, por lo cual se considera la saturación del electrodo, dando como consecuencia un sensor un una linealidad desde 0 hasta $150\mu\text{M}$.

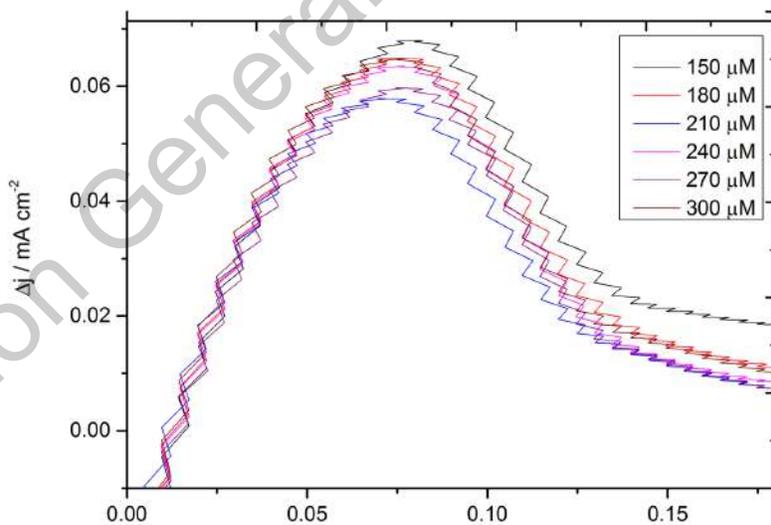


FIGURA 32. Voltamperometría de Pulso Diferencial del electrodo modificado C/CuAg con concentraciones de $150 - 300\mu\text{M}$ de creatinina en fluido simulado pH 7

Para obtener los límites de detección y cuantificación se consideraron los parámetros de la tabla 24 en ausencia de creatinina y las ecuaciones 1 y 2 previamente reportadas en este trabajo con lo que se obtuvo los siguientes resultados.

$$LDD = \frac{3 \cdot 0.00057}{0.0007} = 2.4 \mu M$$

$$LDC = \frac{10 \cdot 0.00057}{0.0007} = 8.14 \mu M$$

De acuerdo con la tabla 17 donde se reporta que los valores oscilan entre los 30 μM hasta los 99 μM , podemos concluir que los datos obtenidos se encuentran dentro de los parámetros, permitiendonos el cálculo de la creatinina en presencia de sales como interferentes.

4.10.2 Urea en Fluido simulado de saliva

Para conocer el comportamiento del electrodo de PANI/NTC/Urs en fluido simulado, se corrió una voltamperometría cíclica y se comparó contra otra voltamperometría en solución buffer, la figura 33 muestra ambas pruebas y se observa que hay un ligero corrimiento de potencial, dado que la solución buffer tiene un pico oxidativo en un potencial 0.1V y se observa un corrimiento a la derecha del potencial en 0.15V.

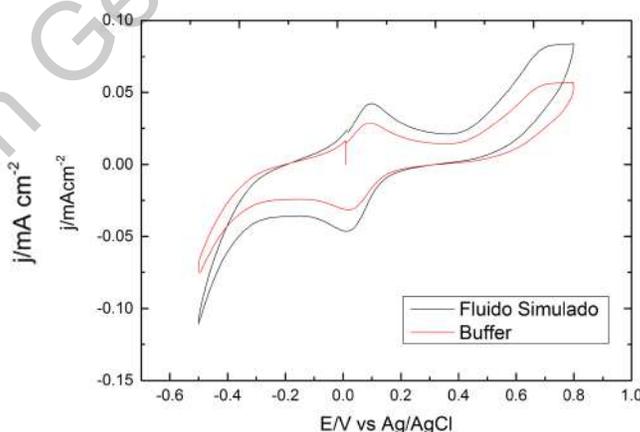


FIGURA 33. Voltamperometría cíclica del electrodo modificado PANI/NTC/Urs en fluido simulado y buffer de fosfatos pH 7 a 20mVs-1

Posteriormente se realizaron pruebas electroquímicas para conocer el comportamiento del electrodo de PANI/NTC/Urs en fluido simulado en presencia y ausencia de urea, la comparativa puede observarse en la figura 33, donde se observa un que la corriente sufre un decaimiento.

La curva de calibración se realizó con una cronopotenciometria en una solución buffer con 10 adiciones de alícuotas de fluido simulado con urea 1M. La figura 34 muestra el comportamiento del fluido simulado en presencia de urea, donde se observa que el potencial se estabiliza en 1.27 V y comienza a descender con las adiciones de urea.

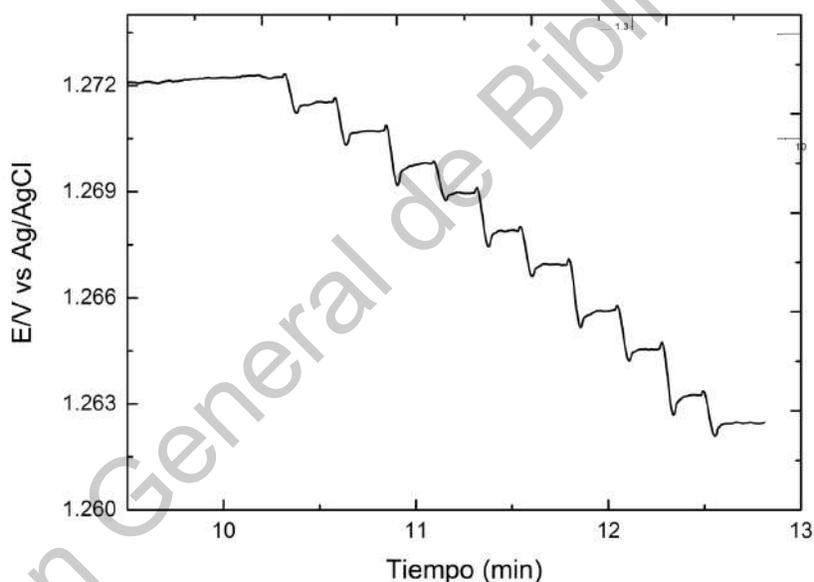


FIGURA 34. Cronopotenciometría de urea en fluido simulado pH 7.

Los valores para la curva de calibración se muestran en la tabla 25, mientras que en la figura 34 se presenta la línea de tendencia central con un valor de $R^2 = 0.996$ y una ecuación de $y = -5.0894x + 1.2728$. Con los resultados obtenidos podemos afirmar que el comportamiento de la urea en fluido simulado en el rango de 0 – 2 mM es de forma lineal.

TABLA 25. Relación de las concentraciones de urea en fluido simulado y la variación de potencial Volts.

Concentración (mM)	1	2	3	Promedio	Error
0	1.273	1.2722	1.2727	1.2726	0.0004
0.2	1.2711	1.2714	1.2719	1.2715	0.0004
0.4	1.2706	1.2705	1.2714	1.2708	0.0005
0.6	1.2694	1.2697	1.2702	1.2698	0.0004
0.8	1.2682	1.2691	1.2694	1.2689	0.0006
1.0	1.2676	1.268	1.2683	1.2680	0.0004
1.2	1.2665	1.2669	1.2673	1.2669	0.0004
1.4	1.2654	1.2657	1.2662	1.2658	0.0004
1.6	1.2644	1.2646	1.2651	1.2647	0.0004
1.8	1.2634	1.2633	1.2639	1.2635	0.0003
2.0	1.2618	1.2625	1.2625	1.2623	0.0004

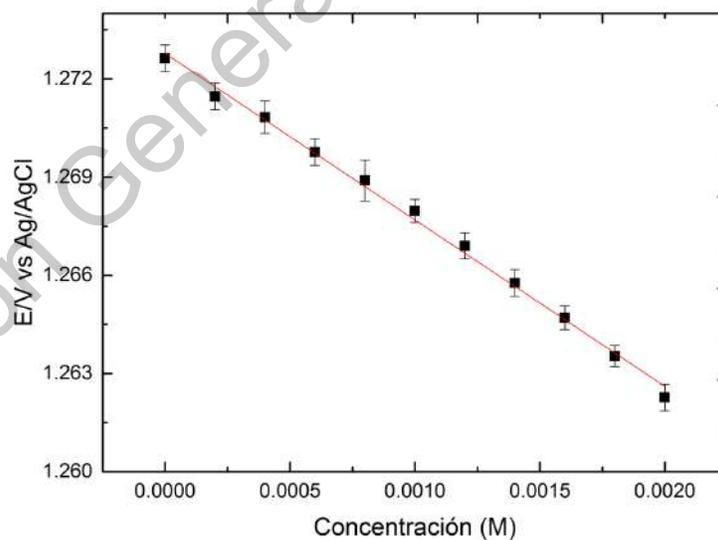


FIGURA 35. . Curva de calibración de urea en fluido simulado de saliva pH 7

$$R^2 = 0.996, y = -5.0894x + 1.2728$$

Por último se obtiene los límites de detección y cuantificación como se ha reportado anteriormente y con los valores de la tabla 25 para la ausencia de urea en fluido simulado.

$$LDD = \frac{3 \cdot 0.004}{5.089} = 0.0023 \text{ mM}$$

$$LDC = \frac{10 \cdot 0.004}{5.089} = 0.0067 \text{ mM}$$

Los parametros obtenidos de LDD y LDC se comparan con los previamente reportados en la tabla 21, en la cuál el valor de urea para pacientes sanos es de 6.49 mM, valor que se encuentra por encima del límite de cuantificación presentado en este trabajo, por lo tanto podemos afirmar que el electrodo de PANI/NTC/Urs permite la detección y cuantificación de urea por medio de los cationes NH_3 .

5. Conclusión

A partir de los resultados obtenidos, podemos concluir que el material denominado CuAg, es un fuerte candidato para la cuantificación de creatinina, no sólo porque mostró un comportamiento lineal en la relación corriente vs concentración, sino porque es capaz de detectar concentraciones de $0.092 \mu\text{M}$, por lo cual se abre la puerta al sensado en fluidos de baja concentración.

El sensado de urea a partir de una inmovilización covalente de ureasa sobre nanotubos de carbón soportados en un polímero conductor de polianilina se realizó de forma exitosa desde dos métodos; el primero basada en una inmovilización con un acoplamiento de enzima sobre electrodo del 80% en un tiempo máximo de 90 minutos, obteniendo un electrodo eficiente y en un corto periodo de tiempo. En segundo lugar, se obtiene una respuesta electroquímica para la reacción de hidrólisis de la urea, que además se comporta de forma lineal.

Otro factor importante a resaltar, es que los electrodos presentan respuesta favorable en un fluido simulados de saliva, sin embargo es necesario realizar las pruebas respectivas en saliva real para conocer de forma certera el comportamiento de los electrodos y mejorar las curvas de calibración. De acuerdo a los resultados obtenidos, nos indican que es posible cuantificar en fluidos biológicos de baja concentraciones de forma no invasiva analitos como creatinina y urea.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, se lograron desarrollar electrodos sensibles a urea y creatinina en fluidos simulados de saliva, sin embargo, no presentaron selectividad, por lo cual el objetivo general del presente trabajo se cumplió de forma parcial.

Por otra parte, a pesar del bajo limite de detección alcanzado en los fluidos simulados de saliva, no se llegó al desarrollo de dispositivo, por lo cual la hipótesis es rechazada.

6. Anexos

6.2 Perspectivas

Se espera continuar con el proyecto buscando realizar un dispositivo flúidico que nos permita mejorar las señales, para llegar a un prototipo médico con el objetivo de mejorar los análisis existentes.

El diseño del dispositivo se presenta en la figura 36, donde se observa en la imagen a un canal con dos entradas y una salida, esto considerando que una muestra de saliva real requiera un pretratamiento para su cuantificación.

Los electrodos de trabajo de papel toray deben ubicarse entre la plataforma superior e inferior (b y c), mientras los electrodos de pseudo referencia se ubican de forma separada y perpendicularmente al electrodo de trabajo.

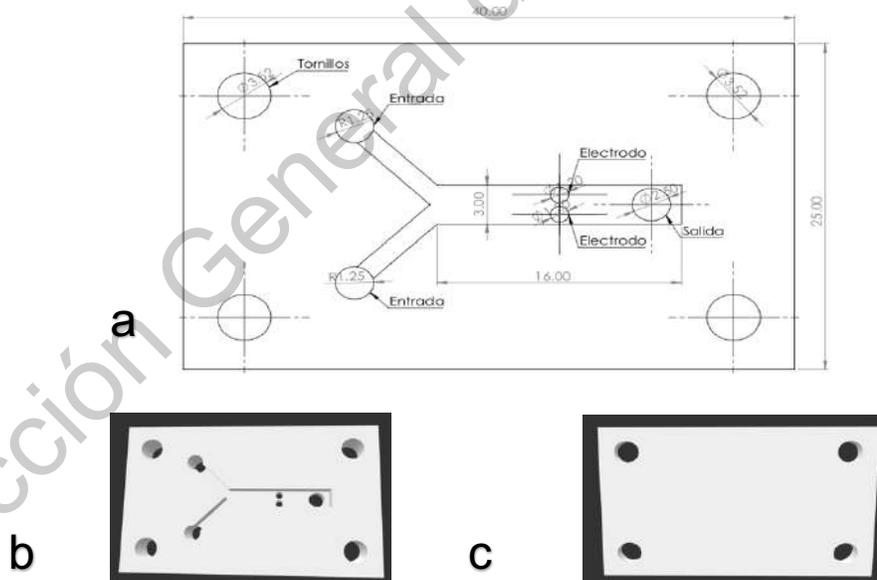


FIGURA 36. Diseño de celda para el sensado de creatinina y urea simultanea

6.2 Productos

- Ponencia en el 13vo coloquio del Posgrado de Ingenia con el trabajo titulado “Sensor electroúmico de creatinina”
- Participación en “The 19th International Conference on Micro and Nanotechnology for Power Generation and Energy Conversion Applications” en Cracovia con el trabajo titulado: “CuAg electrode for creatinine microfluidic fuel cell based self-powered electrochemical sensor”
- Artículo publicado en IEEE con DOI: 10.1109/powerMEMS49317.2019.61547401764

7. Referencias

- Abgrall, P., & Gue, A. M.** (2007). Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem—a review. *Journal of micromechanics and microengineering*, 17(5), R15.
- Ahn, C. H., Choi, J. W., Beaucage, G., Nevin, J. H., Lee, J. B., Puntambekar, A., & Lee, J. Y.** (2004). Disposable smart lab on a chip for point-of-care clinical diagnostics. *Proceedings of the IEEE*, 92(1), 154-173.
- Alegret, S., & Martínez-Fàbregas, E.** (1989). Biosensors based on conducting filled polymer all-solid-state PVC matrix membrane electrodes. *Biosensors*, 4(5), 287-297
- Ates, M.** (2013). A review study of (bio) sensor systems based on conducting polymers. *Materials Science and Engineering: C*, 33(4), 1853-1859
- Bacallao Méndez, R.** (2015). La creatinina como indicador del tejido muscular esquelético y el estado nutricional. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 25(S1), S4-S23
- Bandodkar, A. J., & Wang, J.** (2014). Non-invasive wearable electrochemical sensors: a review. *Trends in biotechnology*, 32(7), 363-371.
- Basolo, F., Johnson, R., & Busch, R. H.** (1980). *Química compuestos de coordinación*. Reverté
- Bartlett, P. N., & Wallace, E. N. K.** (2001). The oxidation of ascorbate at poly (aniline)–poly (vinylsulfonate) composite coated electrodes. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 3(8), 1491-1496
- Bea, D. B., Tejada, A. P., Pardo, A. A., & Cuador, J. C.** (2011). Nanomedicina: aspectos generales de un futuro promisorio. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 10(3).
- Beebe, D. J., Mensing, G. A., & Walker, G. M.** (2002). Physics and applications of microfluidics in biology. *Annual review of biomedical engineering*, 4(1), 261-286.
- Boobphahom, S., Ruecha, N., Rodthongkum, N., Chailapakul, O., & Remcho, V. T.** (2019). A copper oxide-ionic liquid/reduced graphene oxide composite

sensor enabled by digital dispensing: Non-enzymatic paper-based microfluidic determination of creatinine in human blood serum. *Analytica chimica acta*, 1083, 110-118.

Butler, C. (1985). *Statistics in linguistics*. B. Blackwell.

Celec, P., Tóthová, L., Šebeková, K., Podracká, L., & Boor, P. (2016). Salivary markers of kidney function—potentials and limitations. *Clinica Chimica Acta*, 453, 28-37

Chicharro, J. L., Lucía, A., Pérez, M., Vaquero, A. F., & Ureña, R. (1998). Saliva composition and exercise. *Sports medicine*, 26(1), 17-27.

Crespihlo, F. N., Iost, R. M., Travain, S. A., Oliveira Jr, O. N., & Zucolotto, V. (2009). Enzyme immobilization on Ag nanoparticles/polyaniline nanocomposites. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(10), 3073-3077

Dagar, K., & Pundir, C. S. (2017). An improved amperometric L-lactate biosensor based on covalent immobilization of microbial lactate oxidase onto carboxylated multiwalled carbon nanotubes/copper nanoparticles/polyaniline modified pencil graphite electrode. *Enzyme and microbial technology*, 96, 177-186

Dario, P., Carrozza, M. C., Benvenuto, A., & Menciassi, A. (2000). Micro-systems in biomedical applications. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 10(2), 235

de Almeida, P. D. V., Gregio, A. M., Machado, M. A., De Lima, A. A., & Azevedo, L. R. (2008). Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J Contemp Dent Pract*, 9(3), 72-80.

Díez Sánchez, P. (2017). Nuevos nanomateriales para el diseño de biosensores electroquímicos y sistemas de liberación controlada (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).

Gallardo, J., Alegret, S., Munoz, R., Leija, L., Hernandez, P. R., & Del Valle, M. (2005). Use of an Electronic Tongue Based on All-Solid-State Potentiometric Sensors for the Quantitation of Alkaline Ions. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 17(4), 348-355

- Guerra-Balcázar, M.**, Morales-Acosta, D., Castaneda, F., Ledesma-García, J., & Arriaga, L. G. (2010). Synthesis of Au/C and Au/Pani for anode electrodes in glucose microfluidic fuel cell. *Electrochemistry Communications*, 12(6), 864-867
- Gomez, C.A.**, Arias, M.E. y Jiménez R.C. (2006). Insuficiencia renal crónica. Sociedad Española de Geriatria y Gerontología. Tratado de Geriatria para residentes. 637-646. Madrid, España. International Marketing & Communication, S.A. (IM&C).
- Granot, E.**, Basnar, B., Cheglakov, Z., Katz, E., & Willner, I. (2006). Enhanced bioelectrocatalysis using single-walled carbon nanotubes (SWCNTs)/polyaniline hybrid systems in thin-film and microrod structures associated with electrodes. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 18(1), 26-34
- Gutierrez, M.**, Alegret, S., Caceres, R., Casadesús, J., Marfa, O., & Del Valle, M. (2007). Application of a potentiometric electronic tongue to fertigation strategy in greenhouse cultivation. *Computers and Electronics in Agriculture*, 57(1), 12-22.
- Gutiérrez, M.**, Alegret, S., & del Valle, M. (2008). Bioelectronic tongue for the simultaneous determination of urea, creatinine and alkaline ions in clinical samples. *Biosensors and bioelectronics*, 23(6), 795-802.
- Imafidon, C. E.**, Akomolafe, R. O., & Oke, O. G. (2020). Saliva renal function biomarkers as alternatives to plasma concentrations in obesity-induced kidney injury. *Obesity Medicine*, 17, 100195.
- Kidneyurology** (2018). Los riñones y su funcionamiento. Recuperado de http://www.kidneyurology.org/ES/pdf_files/KidneyBasicsSpanish.pdf.
- Khadro, B.**, Sanglar, C., Bonhomme, A., Errachid, A., & Jaffrezic-Renault, N. (2010). Molecularly imprinted polymers (MIP) based electrochemical sensor for detection of urea and creatinine. *Procedia Engineering*, 5, 371-374

- Kuralay, F., Özyörük, H., & Yıldız, A.** (2006). Amperometric enzyme electrode for urea determination using immobilized urease in poly (vinylferrocenium) film. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114(1), 500-506.
- Lasisi, T. J., Raji, Y. R., & Salako, B. L.** (2016). Salivary creatinine and urea analysis in patients with chronic kidney disease: a case control study. *BMC nephrology*, 17(1), 10.
- Laska, J., Włodarczyk, J., & Zaborska, W.** (1999). Polyaniline as a support for urease immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 6(6), 549-553
- Lechuga, L. M.** (2011). Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud.
- Lloyd, J. E., Broughton, A., & Selby, C.** (1996). Salivary creatinine assays as a potential screen for renal disease. *Annals of clinical biochemistry*, 33(5), 428-431.
- Luo, Y. C., & Do, J. S.** (2004). Urea biosensor based on PANi (urease)-Nafion®/Au composite electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(1), 15-23.
- Maduell F., & Arias M.,** (2015). Dosis de diálisis, Recuperado de <http://www.revistanefrologia.com/es-monografias-nefrologia-dia-articulo-dosis-hemodialisis-36>
- Mahajan, A. P., Kondawar, S. B., Mahore, R. P., Meshram, B. H., & Virutkar, P. D.** (2015). Polyaniline/MnO₂ nanocomposites based stainless steel electrode modified enzymatic urease biosensor. *Procedia Materials Science*, 10, 699-705.
- Meibodi, A. S. E., & Haghjoo, S.** (2014). Amperometric urea biosensor based on covalently immobilized urease on an electrochemically polymerized film of polyaniline containing MWCNTs. *Synthetic metals*, 194, 1-6.
- Mitewa, M., Bontchev, P. R., & Kabassanov, K.** (1985). A four-membered chelate complex of Cu (II) with creatinine. *Polyhedron*, 4(7), 1159-1161.

- Mitewa, M.**, Gencheva, G., Ivanova, I., Zhecheva, E., & Mechandjiev, D. (1991). Complex formation of monomeric and dimeric copper (II) complexes with creatinine in organic media. *Polyhedron*, 10(15), 1767-1771.
- Mitewa, M.** (1995). Coordination properties of the bioligands creatinine and creatine in various reaction media. *Coordination chemistry reviews*, 140, 1-25.
- Monosik, R.**, Stredansky M., Sturdik, E. (2012). Biosensor-classification, characterization and new trends. *Acta Chimica Slovaca*, 5(1), 109-120, DOI: 10.2478/v10188-012-0017-z.
- Muñoz Botella, S.** (2002). *Formación de complejos de inclusión entre retinoides y ciclodextrinas: Características, propiedades y ventajas analíticas*. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.
- Muralidharan, S.**, Nagaraja, K. S., & Udupa, M. R. (1984). Creatinine complexes of zinc, cadmium and mercury. *Polyhedron*, 3(5), 619-621
- Mutlu, I.**, & Oktay, E. (2013). Characterization of 17-4 PH stainless steel foam for biomedical applications in simulated body fluid and artificial saliva environments. *Materials Science and Engineering: C*, 33(3), 1125-1131
- Nagler, R. M.** (2008). Saliva analysis for monitoring dialysis and renal function.
- Pizzariello, A.**, Stredanský, M., Stredanská, S., & Miertuš, S. (2001). Urea biosensor based on amperometric pH-sensing with hematein as a pH-sensitive redox mediator. *Talanta*, 54(4), 763-772.
- Perry, M.**, Löbel, E., & Bloch, R. (1976). Mechanism of a polymeric valinomycin-based potassium specific electrode. *Journal of Membrane Science*, 1, 223-235
- Pugia, M. J.**, Lott, J. A., Wallace, J. F., Cast, T. K., & Bierbaum, L. D. (2000). Assay of creatinine using the peroxidase activity of copper-creatinine complexes. *Clinical biochemistry*, 33(1), 63-70
- Pundir, C. S.**, Kumar, P., & Jaiwal, R. (2019). Biosensing methods for determination of creatinine: a review. *Biosensors and bioelectronics*, 126, 707-724

- Qin X**, Wang HC, Wang XS, Miao ZY, Chen LL, Zhao W (2010) Amperometric biosensors based on gold nanoparticles-decorated multiwalled carbon nanotubes-poly biocomposite for the determination of choline. *Sens Actuators B* 147:593–598
- Quino, I.**, Ramos, O., & Guisbert, E. (2007). Determinación del límite de detección instrumental (LDI) y límite de cuantificación instrumental (LCI) en elementos traza de agua subterránea. *Revista Boliviana de química*, 24(1), 53-57.
- Raveendran, J.**, Resmi, P. E., Ramachandran, T., Nair, B. G., & Babu, T. S. (2017). Fabrication of a disposable non-enzymatic electrochemical creatinine sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 243, 589-595
- Revejo, A. J.** y Pingarrón J. M., (2000). Biosensores electroquímicos. Una herramienta útil para el análisis medioambiental y clínico, Real sociedad española de química, 5-15.
- Ringbom, A.**, & Montuenga, C. (1979). *Formación de complejos en química analítica* (p. 42). Madrid: Alhambra
- Sanz Bernabé, Á.** (2016). Estudio del tamaño de cristalito en porcelanas industriales.
- Sassolas, A.**, Blum, L. J. & Leca-Bouvier B.D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensor. Elsevier. 30. 489-511-.
- Shen, H.**, Cardwell, T. J., & Cattrall, R. W. (1998). The application of a chemical sensor array detector in ion chromatography for the determination of Na⁺, NH₄⁺, K⁺, Mg²⁺ and Ca²⁺ in water samples. *Analyst*, 123(10), 2181-2184.
- Secretaria de salud** (2018). Enfermedad renal crónica: un problema de salud pública. recuperado de <https://www.gob.mx/salud/articulos/enfermedad-renal-cronica-un-problema-de-salud-publica>.
- Singh, M.**, Verma, N., Garg, A. K., & Redhu, N. (2008). Urea biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 134(1), 345-351
- Situmorang, M.**, Gooding, J. J., Hibbert, D. B., & Barnett, D. (1998). Electrodeposited polytyramine as an immobilisation matrix for enzyme biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 13(9), 953-962.

- Snyder, S.**, & Pendergraph, B. E. R. N. A. D. E. T. T. E. (2005). Detection and evaluation of chronic kidney disease. *Interventions*, 100(1), 24-25
- Stango, S. A. X.**, & Vijayalakshmi, U. (2019). Synthesis and characterization of hydroxyapatite/carboxylic acid functionalized MWCNTS composites and its triple layer coatings for biomedical applications. *Ceramics International*, 45(1), 69-81
- Stone, H. A.**, Stroock, A. D., & Ajdari, A. (2004). Engineering flows in small devices: microfluidics toward a lab-on-a-chip. *Annu. Rev. Fluid Mech.*, 36, 381-411
- Suzuki, H.**, Arakawa, H., & Karube, I. (2001). Fabrication of a sensing module using micromachined biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(9-12), 725-733.
- Suzuki, H.**, & Matsugi, Y. (2005). Integrated microfluidic system for the simultaneous determination of ammonia, creatinine, and urea. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 108(1-2), 700-707
- Tamayo, O. J. A.**, Latri, Q. H. S., (2016). La enfermedad renal crónica en México. Hacia una política nacional para enfrentarla. CDMX, México: Academia nacional de Medicina de México.
- Tomás, I.**, Marinho, J. S., Limeres, J., Santos, M. J., Araújo, L., & Diz, P. (2008). Changes in salivary composition in patients with renal failure. *archives of oral biology*, 53(6), 528-53.
- Thomsen, V.**, Schatzlein, D., & Mercurio, D. (2003). Limits of detection in spectroscopy. *Spectroscopy*, 18(12), 112-114.
- Van de Velde, L.**, d'Angremont, E., & Olthuis, W. (2016). Solid contact potassium selective electrodes for biomedical applications—a review. *Talanta*, 160, 56-65.
- Wei, D.**, & Ivaska, A. (2006). Electrochemical biosensors based on polyaniline. *Chemia analityczna*, 51, 839-852
- Zhybak, M.**, Beni, V., Vagin, M. Y., Dempsey, E., Turner, A. P. F., & Korpan, Y. (2016). Creatinine and urea biosensors based on a novel ammonium ion

selective copper-polyaniline nano-composite. *Biosensors and Bioelectronics*, 77, 505-511

Dirección General de Bibliotecas UAQ