



UNIVERSIDAD DE BURGOS

Departamento de Química
Área de Química Analítica

Trabajo Fin de Grado

PUESTA A PUNTO DE UN BIOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE UREA

Autor: Marta Melgosa Peña
Tutoras del trabajo: Olga Martínez Renedo
y M^a Asunción Alonso Lomillo

Febrero de 2014



Grado en Química

Departamento de Química
Facultad de Ciencias de la Universidad de Burgos

AUTORIZACIÓN DE PRESENTACIÓN DEI TRABAJO FIN DE GRADO ⁽¹⁾

GRADO EN QUÍMICA

CURSO 2013/2014

Dña. OLGA DOMÍNGUEZ RENEDO y Dña. M^a ASUNCIÓN ALONSO LOMILLO, Directoras del Trabajo Fin de Grado de Dña. MARTA MELGOSA PEÑA, que lleva por título: PUESTA A PUNTO DE UN BIOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE UREA,

Autorizan

No autorizan

A presentar la Memoria adjunta y defender públicamente el trabajo mencionado.

Burgos, a 24 de FEBRERO de 2014

Fdo.: OLGA DOMÍNGEZ RENEDO

Fdo.: M^a ASUNCIÓN ALONSO LOMILLO

(1). Para la presentación del Trabajo Fin de Grado el alumno deberá tener superados 222 créditos ECTS en el Grado en Química o 228 créditos ECTS en el Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. (Regulación de las Prácticas Externas y del Trabajo Fin de Grado de la Facultad de Ciencias, aprobado en Junta de Facultad de 15/06/2010).

D. _____ Jefe del Negociado o Administrador de la Secretaría de Alumnos, certifica que el alumno arriba mencionado tiene superado 222/228 créditos correspondientes al Grado en Química.

Burgos, a de de

Fdo.:

ÍNDICE

1. – INTRODUCTION	4
2. – STATE OF THE ART.....	4
2.1. - UREA.....	4
2.2. – ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS.....	6
3. – OBJETIVE	8
4. – EXPERIMENTAL.....	8
4.1. – REAGENTS	8
4.2. – APPARATUS	8
4.3. – EXPERIMENTAL PROCEDURE.....	9
4.3.1. - Amperometric measurements	9
4.3.2.- Preparation of SPCEs modified with AuNPs	9
4.3.3. - Immobilization of urease on SPCEs, SPCTTEs and AuNPs-SPCEs.....	9
5. – RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
5.1. - SELECCIÓN DEL POTENCIAL DE TRABAJO.....	9
5.2. – SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DE INMOVILIZACIÓN DEL ENZIMA UREASA	10
5.3. - SELECCIÓN DEL PH DE TRABAJO.....	11
5.4. – ELECTRODOS MODIFICADOS CON TTF.....	12
5.5. – ELECTRODOS MODIFICADOS CON NANOPARTÍCULAS DE ORO.....	13
5.5.1.- Precisión y capacidad de detección	15
5.5.2 – Determinación de urea en una muestra enriquecida de plasma humano .	16
6. – CONCLUSIONES	16
7. – BIBLIOGRAFÍA	17

1. – INTRODUCTION

Urea, one of the end products of nitrogen metabolism, has great significance in clinical chemistry where the measurement of urea in blood is the best way to evaluate kidney function and identifying kidney disease. Moreover, urea is widely distributed in nature and its analysis is necessary in food chemistry and environmental monitoring. Therefore, the development of simple, fast and sensitive analytical methods to analyze this compound is essential.

The conventional analytical techniques used, although precise, are tedious and time consuming. However, electrochemical biosensors have the advantages of ease of use, portability and the ability to furnish real-time signals. Among them, amperometric enzymatic biosensors based on urease have a leading position. These devices combine the selectivity of the enzyme for the recognition of the analyte with the direct transduction of the rate of the biocatalytic reaction into a current signal. Moreover, these systems allow a rapid, simple and direct determination of urea.

The use of screen-printed electrodes (SPEs) as transducers in the construction of urease based biosensors offer additional advantages related to their disposable character and great versatility. This versatility lies in the wide range of possible methods of modification, including the incorporation of redox mediators or metallic nanoparticles on the electrode surface. The latter improve the sensibility of the disposable biosensors due to their excellent catalytic properties.

In this work, a simple electrochemical method for the determination of urea has been developed. The method is based on the immobilization of the enzyme urease on screen-printed carbon electrodes (SPCEs) modified with gold nanoparticles (AuNPs).

A first step in this work has been the optimization of the experimental parameters to allow precise, sensible and selective measurements of urea. In this way, an optimization of the working potential and the pH value of the analytical medium has been carried out. Moreover, the optimization of the experimental variables, which may influence the immobilization of the enzyme on the electrode, has been also carried out.

Finally, in order to probe the performance of the method, the developed biosensor has been applied to the analysis of urea in a spiked sample of human plasma.

2. – STATE OF THE ART

2.1. - UREA

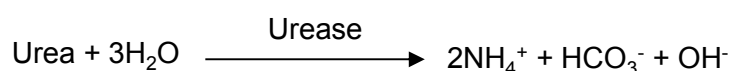
Urea is an organic chemical compound of molecular formula CON_2H_4 . In humans it is one of the main waste products produced after metabolize proteins. This compound has great significance in clinical chemistry where blood urea level is an indicator of possible kidney malfunction in human body. An increase in urea level in blood and urine causes a number of health concerns including renal failure, urinary tract obstruction, dehydration, etc. However, a reduced level of urea may be responsible for hepatic failure and nephritic syndrome [1]. Apart from being crucial as an indicator of liver and kidney function, the blood urea test is also used as a marker for quantification and monitoring of hemodialysis treatment [2]. Moreover, urea is widely distributed in nature and its analysis is necessary in food chemistry and environmental monitoring. In this way, in food analysis, urea is routinely quantified for

instance in cow's milk, since urea is commonly used as an adulterant for milk which reduces its nutritious value [1, 2].

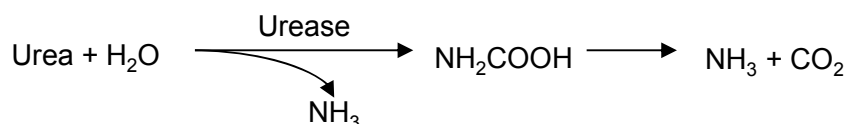
Urea can stress the environment in different ways because it acts as a nitrogenous fertilizer. It decomposes to ammonia, which is very toxic, and so it can pollute streams and rivers into which it drains. Since urea is widely distributed in nature and toxic above certain concentrations, it is of utmost interest to develop cost-effective techniques for real-time monitoring in all human-related environments [2].

Various methods are available for determination of urea, including chromatography and capillary electrophoresis. These methods usually require pretreatment or conditioning of the sample being therefore time consuming and not adequate in routine analysis [4]. On the contrary, biosensors are preferred because they are cost effective, easy, fast, and efficient techniques for detection of various biomolecules. A number of transducers have been reported for detection of urea including conductometric, thermal, potentiometric, etc. Amperometric biosensors are promising methods for the determination of urea, because of its effectiveness, simplicity and ease of calibration [1, 4].

Most of the existing amperometric biosensors for urea determination utilize urease as the sensing element. In these biosensors, the enzyme immobilized on the electrode surface catalyzes the hydrolysis of urea, in an overall reaction leading to the formation of ammonium, bicarbonate and hydroxide ions as follows [5]:



The principle of the amperometric determination of urea is not well established. Some authors affirm that the ionic products of the above-mentioned reaction change the electronic properties of the biosensor electrode, which can be observed using amperometric techniques [6]. However, other authors set that urea can be eventually converted to ammonia and carbon dioxide via carbamic acid catalyzed by urease [6, 7]:



Carbamic acid is an electroactive product, which can be oxidized on the electrode and, therefore, detected by amperometry [6].

In table 1 is summarized the analytical characteristics of the different amperometric urea biosensors described in literature. Most of these electrochemical methods involve tedious and complex immobilization procedures.

Table 1. - Amperometric urease based biosensors for the determination of urea

Ref.	Electrode	RSD		Capability of detection
		Reproducibility	Repeatability	
[2]	Platinum electrode modified with electrodeposited rhodium on a polymer membrane	5.1%		0.05 mM
[4]	Glassy carbon electrode coated with poly(glycidyl methacrylate-covinylferrocene)			0.06 mM
[5]	Platinum electrode modified with a nanocomposite film	-	-	-
[6]	Glassy carbon electrode modified with urease immobilized on carbon sheet		3.3%	0.20 mM
[8]	Gold electrode coated with a poly(N-glycidylpyrrole-co-pyrrole) conducting film	3.8%	-	0.02mM
[9]	Platinum electrode modified with rhodium nanoparticles and a chitosan membrane	5.9%	-	0.50 mM
[10]	Indium-tin oxide electrode modified with gold nanoparticles functionalized with hyperbranched polyester-Boltron® H40	6.0%	8.0%	0.01 mM
[11]	Platinum electrode modified with a poly(vinylferrocenium) film	-	-	-
[12]	Glassy carbon electrode modified with Polyaniline-Perfluorosulfonated Ionomer	2.2 %	-	0.50 μ M

RSD: Relative standard deviation

The possibilities of amperometric biosensors can be increased by using SPES due to their disposable character and their particular applicability for in situ determinations [13]. Thus, in this work a disposable amperometric biosensor based on the immobilization of the enzyme urease on a SPCE has been developed.

2.2. – ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS

A chemical sensor is a device capable of translating the chemical information from a sample in a useful analytical signal [14, 15]. Chemical sensors consist of two basic components: a molecular or ionic recognition (receptor), and an instrumental element (transducer), which translates the interaction in a processable signal (Figure 1). Both components may be integrated, as the primary signal generated in the reaction

of recognition (electrochemical, optical, thermal or mass) is finally converted by the transducer in a secondary signal, usually of electrical nature [16].



Figure 1 - Schematic diagram of the operation of a chemical sensor.

Biosensors represent an important subclass of chemical sensors, being an effective tool in real sample analysis due to their selectivity and sensitivity. A biosensor is a chemical sensor that uses biologically sensitive material to detect biological or chemical species without the need for complex sample processing. Therefore, in a biosensor, the biological element is the receptor, which selectively interacts with the analyte [17].

Most of the developed biosensors, described in bibliography, are based on the use of enzymes as the biological component due their fast and easily ability to form selective bonds with the substrate [17].

Among the different types of transducers, the electrochemical one has attracted particular interest due to its robustness, simple and economical manufacture, its wide range of linearity and adequate response time [16, 18].

Electrochemical biosensors are based on a bio-reaction process involving electrochemical signal that can be measured by using an appropriate detection mechanism. Depending on the type of electrochemical signal, electrochemical biosensors can be classified as potentiometric, conductimetric or amperometric biosensors. Among them, amperometric ones are the most frequently used. They are based on the measurement of the current intensity arising from the oxidation or reduction of an electroactive species on an electrode by applying a constant potential [17].

The change of the conventional solid electrodes by SPEs has increased the possibilities of electroanalytical techniques in the biosensor field. Various advantages including simple fabrication, low cost, small size, disposability, portability and easily mass-produced reinforce the use of screen-printed biosensors. Moreover, SPEs avoid some common problems related to traditional solid electrodes such as the needed cleaning processes. Thus, SPEs are extensively used in the fabrication of disposable biosensors [19].

The design of new nanoscale material has acquired ever greater importance in recent years due to their wide-ranging applications in various fields. Among these materials, metallic nanoparticles are of great interest. Due to their reduced size, metallic nanoparticles exhibit important physical and electrical properties that made them very useful for the construction of more sensitive electrochemical biosensors [20]. In this way, the modification of the electrode surface with metallic nanoparticles increases the effective surface area, improves mass transport and, in some cases, the catalytic properties by nanoparticles may reduce the working potential or even improve

the reversibility of some redox processes [21]. Thus, the modification of SPEs with metallic nanoparticles increases the already well-known performance of these kinds of disposable electrodes.

The bibliography lists numerous methods describing the synthesis of metallic nanoparticles. They include chemical synthesis by means of reduction using different agents, UV light or electron-beam irradiation and electrochemical methods [13]. The latter provides an easy and rapid alternative for the preparation of metallic nanoparticles modified electrodes within a short period of time. In this context, the combination of electrodeposition and the screen-printing process is beginning to allow mass production of electrochemical biosensors [13].

Bearing in mind the interesting properties of metallic nanoparticles and SPEs, in this work, the modification of SPCEs with AuNPs is proposed in order to increase the sensitivity of urease based disposable biosensors. The developed biosensors present an easy analytical procedure for the determination of urea in human plasma samples.

3. – OBJECTIVE

The main goal of this work is to develop a sensitive electrochemical method for the determination of urea based on a disposable urease amperometric biosensor.

4. – EXPERIMENTAL

4.1. – REAGENTS

All the reagents used were of analytical grade and Milli Q water (Millipore, Bedford, USA) was employed for preparing all solutions.

A 0.1 M phosphate (NaH_2PO_4 , Panreac, Barcelona, España) and 0.1 M KCl (Merck, Darmstadt, Alemania) solution was used as supporting electrolyte in amperometric measurements. A 2.0 M NaOH (J.T. Baker, Deventer, Países Bajos) solution was used for adjusting pH values.

Urease (EC 3.5.1.5., Sigma, Steinheim, Germany), glutaraldehyde (GA) (Sigma, Steinheim, Germany) and bovine serum albumine (BSA) (Sigma, Steinheim, Germany) were used in the construction of the disposable biosensors. Urease and BSA solutions were prepared in 0.1 M phosphate buffer (pH 7). GA solution was prepared in Milli-Q water.

Stock solutions of urea were prepared in water using urea (Merck, Darmstadt, Germany).

0.1 mM Au (III) solutions were prepared by dissolving the appropriate amount of hydrogen tetrachloroaurate-(III) trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) in 0.5 M sulfuric acid (Merck, Darmstadt, Germany).

4.2. – APPARATUS

Electrochemical measurements were made using an μ Autolab type III electrochemical system with GPES software (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands).

pH of solutions was measured with a Crison Model 2002 (Barcelona, Spain) pHmeter.

4.3. – EXPERIMENTAL PROCEDURE

4.3.1. - Amperometric measurements

Amperometric measurements were carried out in a batch system. All measurements were made at room temperature in an electrochemical cell containing 5 ml of supporting electrolyte, with constant stirring. The working electrode operated at +1.5 V vs a Ag/AgCl screen-printed electrode (Ag/AgCl SPE).

4.3.2. - Preparation of SPCEs modified with AuNPs

The electrochemical deposition of AuNPs was performed in a 100 μ l drop of 0.1 mM HAuCl₄, prepared in 0.5 M H₂SO₄, applying a potential of +0.18 V vs Ag/AgCl SPE during 15 s. The AuNPs modified SPCEs (AuNPs-SPCEs) were then washed with Milli-Q water.

4.3.3. - Immobilization of urease on SPCEs, SPC_{TF}Es and AuNPs-SPCEs

Urease enzyme was immobilized on the working electrode surface using a crosslinking process with GA and BSA. Different volumes of a urease (6% w/v), BSA 3% (w/v) and GA 2.5% (v/v) solutions were sequentially deposited on the electrode surface. One deposited, the electrodic system was allowed to dry for 90 min at 4° C.

5. – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En una primera fase del trabajo se estudió la posibilidad de emplear SPCEs como transductores para la construcción de biosensores para la determinación de urea, basados en la utilización del enzima ureasa.

Con este objetivo, se llevó a cabo la modificación de un SPCE con el enzima ureasa mediante entrecruzamiento (ureasa-SPCE).

5.1. - SELECCIÓN DEL POTENCIAL DE TRABAJO

La respuesta electroquímica de un biosensor amperométrico se encuentra, naturalmente, influenciada por el potencial de trabajo. Por ello, en una primera etapa se llevaron a cabo diferentes experiencias con el objetivo de encontrar el valor más adecuado para dicho parámetro.

Los diferentes experimentos se realizaron utilizando ureasa-SPCEs, en los que la inmovilización del enzima se realizó siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.3.3. En este caso, los volúmenes de las disoluciones de ureasa, BSA y GA utilizados fueron 4.0 μ l, 2.0 μ l y 2.0 μ l, respectivamente:

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para los diferentes potenciales de trabajo analizados para una disolución de urea de concentración 0.6 mM. El valor de pH utilizado fue de 7.

Tabla 2.- Optimización del potencial de trabajo en ureasa-SPCEs

POTENCIAL (V) vs Ag/AgCl SPE	INTENSIDAD (μ A)
+1.0	---
+1.1	---
+1.2	---
+1.3	---
+1.4	---
+1.5	1.5

En la tabla anterior puede verse que, únicamente se obtuvo respuesta electroquímica para valores elevados de potencial de trabajo. Concretamente, para valores superiores a +1.5 V vs Ag/AgCl SPE.

5.2. – SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DE INMOVILIZACIÓN DEL ENZIMA UREASA

Una de las etapas más importantes en la construcción de un biosensor electroquímico consiste en la unión del material biológico al electrodo. Este proceso, conocido como inmovilización, no debe alterar las propiedades intrínsecas del enzima utilizado.

Entre los métodos de inmovilización de enzimas sobre superficies electrónicas se encuentra el entrecruzamiento. Este método de inmovilización implica la formación de enlaces covalentes intermoleculares entre el enzima y un agente bifuncional como el GA. Para minimizar las pérdidas de actividad enzimática debido al entrecruzamiento, en algunas ocasiones, es necesario utilizar una proteína rica en lisina, por ejemplo BSA. Se trata de un método muy sencillo para la inmovilización de enzimas sobre superficies electrónicas y, por ello, ha sido el método seleccionado para la construcción de los biosensores desarrollados en este trabajo.

En la figura 2 se muestra un esquema representativo del proceso de entrecruzamiento seguido en el presente trabajo.

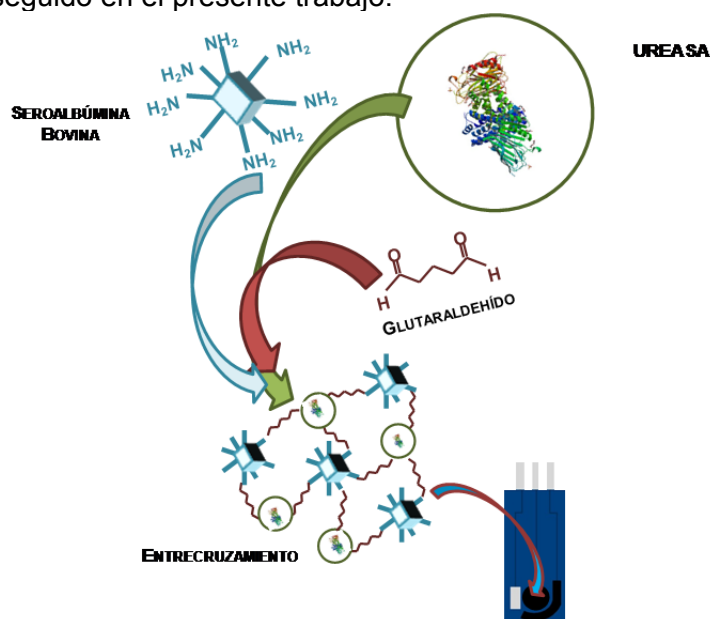


Figura 2 – Proceso de inmovilización del enzima ureasa mediante entrecruzamiento

Naturalmente, las condiciones de inmovilización del enzima pueden influir considerablemente en la respuesta electroquímica generada por el biosensor. Por ello, se llevó a cabo una etapa de optimización de las variables que afectan al proceso de inmovilización. Dichas variables son: concentración del enzima (ureasa), concentración del agente bifuncional (GA) y, concentración de BSA.

La optimización del proceso de inmovilización se realizó, de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 4.3.3., variando el volumen depositado sobre la superficie electródica, de tres disoluciones:

- (1) Disolución de ureasa (6% p/v)
- (2) Disolución de GA (2.5% v/v)
- (3) Disolución de BSA (3% p/v)

Los resultados mostrados en la tabla 3 recogen los valores de intensidad medidos para una concentración de urea 0.6 mM en las diferentes condiciones de inmovilización, aplicando un potencial de +1.5 V vs Ag/AgCl SPE y, utilizando un valor de pH de 7.

Tabla 3.- Optimización del proceso de inmovilización del enzima ureasa en SPCEs

V_{UREASA} (μl)	V_{BSA} (μl)	V_{GA} (μl)	INTENSIDAD (μA)
4.0	3.0	2.0	1.6
4.0	2.0	2.0	9.3
4.0	1.0	2.0	4.6
4.0	0.0	2.0	1.7
3.0	0.0	2.0	15.6
2.0	2.0	2.0	8.6
2.0	1.0	2.0	6.9
2.0	0.0	2.0	2.9
1.0	0.0	2.0	6.4

En la tabla 3 puede verse que los electrodos que presentaban una mayor respuesta son los modificados con 3.0 μl de ureasa, 0.0 μl de BSA y 2.0 μl de GA.

5.3. - SELECCIÓN DEL pH DE TRABAJO

La etapa siguiente del proceso de optimización consistió en la determinación del valor de pH más adecuado para llevar a cabo la medida amperométrica. Para ello, se realizaron diferentes experiencias utilizando SPCEs modificados según las condiciones de inmovilización optimizadas y empleando un potencial de +1.5 V vs Ag/AgCl SPE. Dichas experiencias consistieron en el registro de la respuesta amperométrica obtenida para una concentración de urea 0.6 mM a diferentes valores de pH.

Los valores de pH estudiados fueron 5, 6, 7 y 8. Las experiencias realizadas demostraron que únicamente se observaba respuesta amperométrica para el valor de

pH 7. Por tanto, éste fue el valor seleccionado para llevar a cabo la determinación cuantitativa de urea con el biosensor construido. Sin embargo, tal y como puede observarse en la figura 3, no fue posible llevar a cabo un calibrado utilizando dicho biosensor.

En todas las experiencias realizadas bajo las condiciones optimizadas, el biosensor únicamente daba respuesta a la primera adición de urea en la celda electroquímica. Por ello, se decidió utilizar otro tipo de dispositivos desechables como transductores en la construcción del biosensor. Concretamente, se utilizaron SPCEs modificados con un mediador, el tetratrafalvaleno (TTF). La utilización de mediadores electroquímicos permite en muchas ocasiones trabajar a potenciales bajos debido a la cinética rápida de los procesos redox en los que están implicadas estas especies. El proceso de medida con estos electrodos se describe en el apartado siguiente.

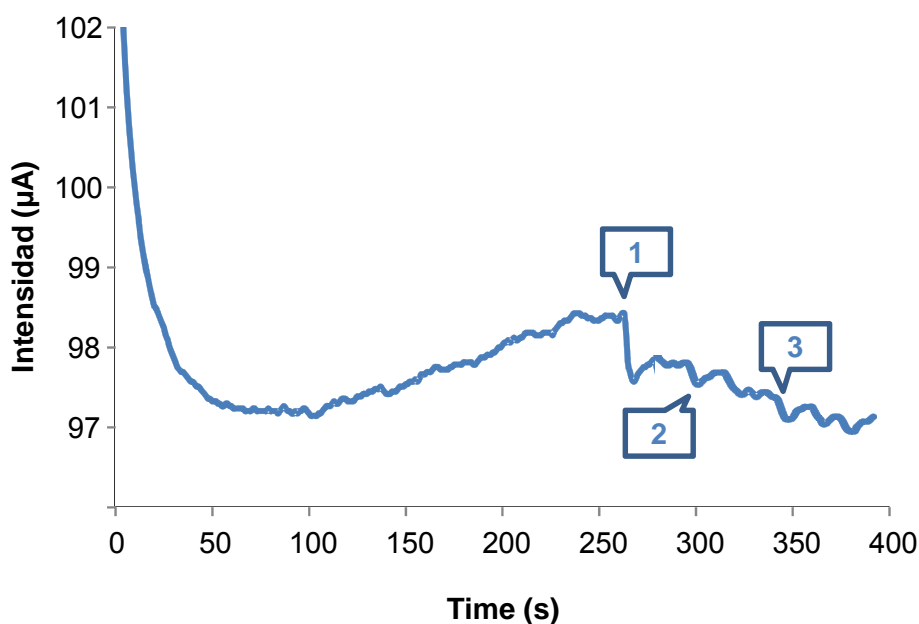


Figura 3.- Respuesta amperométrica obtenida empleando un SPCE modificado con ureasa para una concentración de urea: (1) 0.5 mM; (2) 1.0 mM; (3) 1.5 mM (Potencial de trabajo, +1.5 V vs Ag/AgCl-SPE; pH, 7 Tampón fosfato)

5.4. – ELECTRODOS MODIFICADOS CON TTF

Las experiencias realizadas con biosensores construidos, utilizando las condiciones óptimas de inmovilización del enzima ureasa y, empleando SPCEs modificados con TTF (SPC_{TTF}Es), como transductores, no dieron resultados satisfactorios en el análisis de urea.

Con este tipo de biosensores se probaron diferentes condiciones experimentales que incluyeron potenciales de trabajo comprendidos entre 0 y +1.5 V y, valores de pH del medio de 7. Ninguna de las experiencias realizadas a diferentes potenciales de trabajo generó una respuesta analítica que permitiese el análisis cuantitativo de urea. Por ello, se decidió llevar a cabo el proceso de modificación del electrodo de trabajo que se describe en la siguiente sección.

5.5. – ELECTRODOS MODIFICADOS CON NANOPARTÍCULAS DE ORO

Tal y como se ha descrito anteriormente, la modificación de la superficie electródica con nanopartículas metálicas permite obtener, generalmente, biosensores más sensibles. Por ello, en vista de los pobres resultados obtenidos utilizando SPCEs, se decidió llevar a cabo la modificación de los mismos con AuNPs (AuNPs-SPCEs). El proceso de modificación seguido es el descrito en la sección 4.3.2.

Un primer paso en el proceso de construcción de los biosensores basados en AuNPs-SPCEs consistió en la optimización de las condiciones de inmovilización del enzima y del potencial de trabajo. Los resultados obtenidos en las diferentes experiencias realizadas son los recogidos en la tabla 4. Dichos datos reflejan los valores de intensidad obtenidos para una concentración de urea 0.6 mM y un valor de pH del medio igual a 7. El pH del medio no fue modificado teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las etapas anteriores, en las que únicamente se obtuvo respuesta electroquímica para dicho valor de pH. En cuanto a las disoluciones de ureasa, BSA y GA, utilizados en este proceso de optimización, éstas fueron las mismas que las descritas en apartados anteriores.

Tabla 4.- Optimización del potencial de trabajo y del proceso de inmovilización del enzima ureasa en AuNPs-SPCEs

V_{UREASA} (μ l)	V_{BSA} (μ l)	V_{GA} (μ l)	POTENCIAL (V) vs Ag/AgCl SPE	INTENSIDAD (μ A)
4.0	2.0	2.0	+1.5	0.7
3.0	0.0	2.0		2.8
4.0	2.0	2.0	+1.4	1.6
4.0	2.0	2.0	+1.0	---

Tal y como puede verse en la tabla anterior, puede decirse que el biosensor que presentaba las características de trabajo óptimas era aquel electrodo modificado empleando volúmenes de 3.0 μ L, 0.0 μ L y 2.0 μ L de ureasa, BSA y GA, respectivamente. En cuanto al potencial de trabajo, los mejores resultados se lograron para valores de +1.5 V vs Ag/AgCl SPE de dicho parámetro. En estas circunstancias se obtuvo la respuesta amperométrica mostrada en la figura 4.

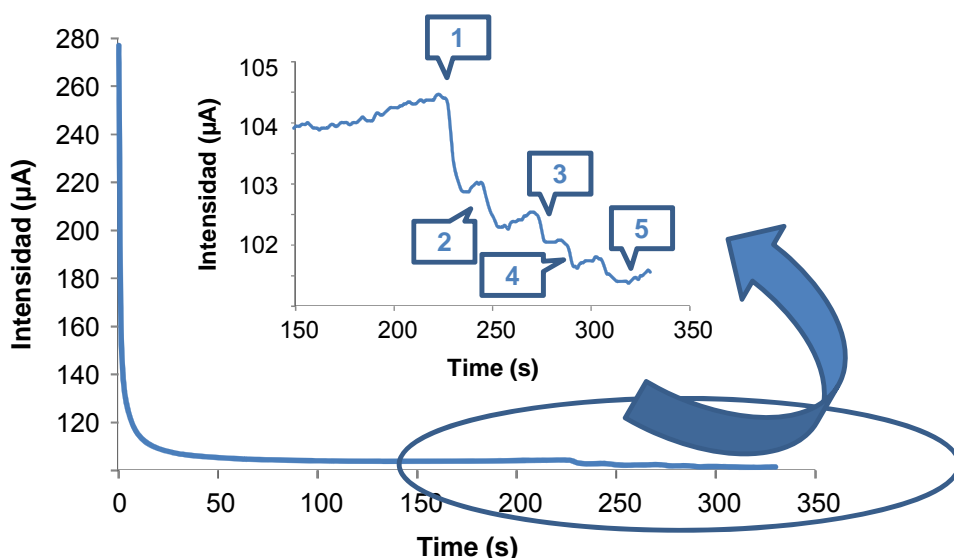


Figura 4- Respuesta amperométrica obtenida empleando un AuNPs-SPCE modificado con ureasa para una concentración de urea: (1) 0.5 mM; (2) 1.0 mM; (3) 1.5 mM; (4) 1.9 mM; (5) 2.4 mM (Potencial de trabajo, +1.5 V vs Ag/AgCl-SPE; pH, 7 Tampón fosfato)

La intensidad de corriente registrada para las diferentes adiciones de urea permite construir la curva de calibración mostrada en la figura 5. En dicha figura puede verse como, efectivamente, existe una relación lineal entre la señal medida y la concentración de urea en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0.5 y 2.4 mM.

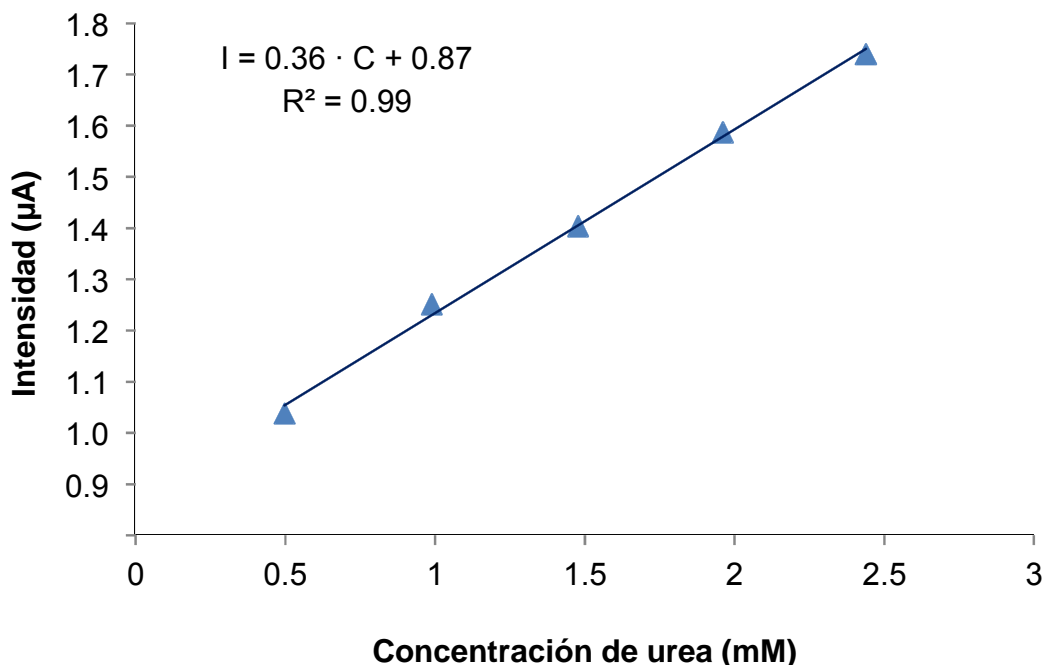


Figura 5.- Curva de calibrado para adiciones crecientes de 25 µL de urea de concentración 0.1 M. (pH, 7 Tampón fosfato; Potencial de trabajo +1.5 V vs. Ag/AgCl SPE)

5.5.1.- Precisión y capacidad de detección

Para caracterizar un procedimiento analítico y asegurar su calidad es importante establecer su precisión, en términos de reproducibilidad y repetibilidad, así como su capacidad de detección.

Inicialmente, se comprobó la reproducibilidad del procedimiento desarrollado. Para la estimación de este parámetro, se llevaron a cabo tres calibrados de urea en las condiciones optimizadas en las etapas anteriores utilizando diferentes AuNPs-SPCEs. En todos los casos se hicieron adiciones de 25 μL de urea de concentración 0.1 M. En la figura 6 se muestran las curvas de calibración obtenidas.

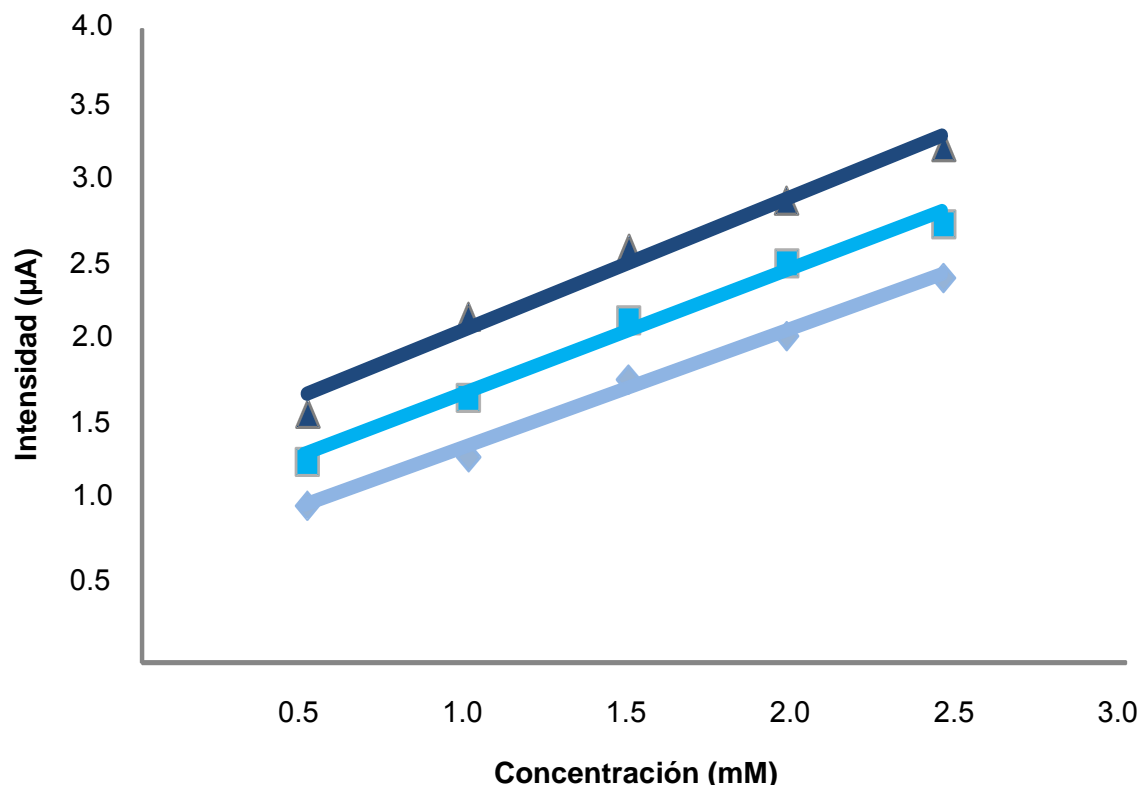


Figura 6. Rectas de calibración construidas para la concentración de urea 0.6 mM, realizados para la estimación de la repetibilidad del sensor.

Una vez construidas las rectas de calibración, la reproducibilidad del método fue calculada en términos del valor de desviación estándar relativa (RSD) asociado a las pendientes de dichas rectas. El valor obtenido para dicho parámetro fue de 6.0 %.

De igual manera se llevó a cabo el cálculo de la repetibilidad del método mediante la construcción de cinco rectas de calibrado en las condiciones óptimas de las variables experimentales, utilizando el mismo AuNPs-SPCE. El valor de RSD asociado a las pendientes de las rectas obtenidas fue 47.9%. Este valor indica que no fue posible la reutilización del electrodo en múltiples ocasiones sin que disminuyera significativamente la sensibilidad del método. Este resultado carece de importancia teniendo en cuenta el carácter desechable de los electrodos utilizados.

El procedimiento analítico desarrollado para la determinación urea fue finalmente caracterizado mediante el cálculo de su capacidad de detección, teniendo en cuenta la probabilidad de falso positivo (α) y falso negativo (β), para lo que se utilizó

el programa DETARCHI [22]. Para el cálculo de dicho parámetro de calidad se utilizaron tres regresiones lineales. El valor de capacidad de detección obtenido fue 1.0 ± 0.4 mM.

5.5.2 – Determinación de urea en una muestra enriquecida de plasma humano

Para demostrar la eficiencia del método desarrollado, se procedió a la realización del análisis de una muestra enriquecida de plasma con una concentración de urea 0.1 M.

El análisis de la muestra se llevó a cabo mediante adición estándar. En primer lugar, se adicionaron 5 ml de la disolución tampón fosfato (pH 7) en la celda electroquímica. A continuación se inició el registro del correspondiente amperograma, una vez que la señal resultó estable se realizó la adición de 30 μ l de la disolución de urea 0.1 M en plasma. Una vez alcanzada de nuevo la estabilidad en la intensidad, se realizaron adiciones sucesivas de 30 μ l de una disolución de urea 0.1 M.

Finalmente, se realizó, mediante extrapolación, el cálculo de la concentración de urea medida con los biosensores optimizados. El resultado obtenido para la concentración de urea en celda fue 0.57 ± 0.03 mM que resultó ser similar al valor teórico esperado (0.59 mM).

6. – CONCLUSIONES

Los resultados de las experiencias realizadas en el presente trabajo pueden ser resumidos en las siguientes conclusiones:

- Los biosensores amperométricos obtenidos mediante la inmovilización del enzima ureasa sobre SPCEs o SPC_{TTF}Es no permiten la determinación cuantitativa de urea.
- Los biosensores amperométricos obtenidos mediante la inmovilización del enzima ureasa sobre AuNPs-SPCEs permiten la determinación cuantitativa de urea.
- Los mejores resultados analíticos empleando ureasa-AuNPs-SPCEs se obtienen para un proceso de inmovilización que implica la deposición secuencial de volúmenes de 3.0 μ l de ureasa 6% (p/v) y 2.0 μ l de GA 2.5% (v/v).
- Las mejores condiciones experimentales para la determinación de urea con ureasa- AuNPs-SPCEs implican la utilización de un potencial de trabajo de +1.5 V vs Ag/AgCl SPE y un valor de pH de 7.
- La reproducibilidad del método propuesto en términos de RSD de las pendientes asociadas a las rectas de calibración, en el intervalo de concentración 0.5 a 2.4 mM, es de 6 % (n=3).
- La capacidad de detección obtenida para la urea en las condiciones óptimas de las variables experimentales es de 1.0 ± 0.4 μ M.
- El biosensor desarrollado resulta adecuado para la determinación de urea en muestras de plasma humano.

7. – BIBLIOGRAFÍA

- [1] N. Batra, M. Tomar, P. Jain, V. Gupta, *Journal of Applied Physics* 114 (2013) 124702-1-124702-7.
- [2] Y. Velichkova, Y. Ivanov, I. Marinov, R. Ramesh, N. R. Kamini, N. Dimcheva, E. Horozova, T. Godjevargova, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 69 (2011) 168–175.
- [3] H. Berrada, G. Font, J. C. Moltó, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 33 (2003) 19–41.
- [4] E. Çevik, M. Şenel, M. F. Abasıyanık, *Journal of Solid State Electrochemistry* 16 (2012) 367–373.
- [5] F. Branzoi, V. Branzoi, A. Musina, *Surface and Interface Analysis*, 44 (2012) 895–898.
- [6] X. Wang, H. Watanabe, N. Sekioka, H. Hamana, S. Uchiyama, *Electroanalysis* 19 (2007) 1300 – 1306.
- [7] F. Kuralay, H. Özyörük, A. Yıldız, *Enzyme and Microbial Technology* 40 (2007) 1156–1159.
- [8] I. Bozgeyik, M. Senel, E. Çevik, M. F. Abasıyanık, *Current Applied Physics* 11 (2011) 1083-1088.
- [9] K. Gabrovska, J. Ivanov, I. Vasileva, N. Dimova, T. Godjevargova, *International Journal of Biological Macromolecules* 48 (2011) 620–626
- [10] A. Tiwari, S. Aryal, S. Pilla, S. Gonga, *Talanta* 78 (2009) 1401–1407.
- [11] F. Kuralay, H. Özyörük, A. Yıldız, *Sensors and Actuators B* 114 (2006) 500–506.
- [12] W.J. Cho, H. J. Huang, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 3946-3951
- [13] O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos Martínez, *Talanta* 73 (2007) 202–219.
- [14] L. Ristic, *Sensor technology and devices*, Norwood (1994).
- [15] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, *Principios de análisis instrumental*, McGraw-Hill, Madrid (2000).
- [16] S. Alegret, M.d. Valle, A. Merkoçi, *Sensores electroquímicos: introducción a los quimiosensores y biosensores. Curso teórico-práctico*, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (2004).
- [17] O. Domínguez, M.J. Arcos, *Electrochemical Biosensors. Encyclopedia of sensors*, American Scientific Publishers, California (2006).
- [18] J.Á. Janata, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 150 A-153 A.
- [19] O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, *Disposable electrochemical biosensors in microbiology*, Formatex, Badajoz (2010).

- [20] O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, L. Ferreira-Conçalves, M.J. Arcos-Martínez, *Talanta* 79 (2009) 1306-1310
- [21] E. Karzt, I. Willner, J. Wang, *Electroanalysis*, 16 (2004) 19-44.
- [22] L. Sarabia, M.C. Ortiz, *Trends in Analytical Chemistry* 13 (1994) 1-6.