



República Bolivariana de Venezuela

Universidad de los Andes

Facultad de Ciencias

Departamento de Química

Laboratorio de Electroquímica

Laboratorio de Investigación en Análisis Químico, Industriales  
y Agropecuario (LIAQIA)



Trabajo Especial de Grado

Evaluación de superficies de carbón vítreo modificadas con quitosano,  
nanopartículas de oro y extractos de ureasa en la determinación de urea en  
suelos

Br. Useche Keymar

Tutor Académico: Prof. Enrique Millán.

Cotutor Académico: Prof. Guillermo Bianchi.

Mérida- Venezuela

Febrero 2017

## Dedicatoria

*A Mi madre Fanny Guevara quien fue mi ejemplo a seguir. Te amo*

*A mis hermanas y sobrinas. Las amo.*

*A Jesús de Sousa. Por apoyarme en todo momento. Te amo.*

## Agradecimientos

A Dios Padre Todopoderoso, por darme la fortaleza, la sabiduría y la paciencia para lograr mis objetivos, por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante mi carrera.

A mi madre Fanny Guevara, por sus consejos y motivación constante, por creer en mí y enseñarme a valorar los estudios y a superarme cada día.

A mis hermanas Fátima y Génesis por apoyarme en todo momento y alentarme para continuar.

A Jesús por siempre estar conmigo en los momentos difíciles, por apoyarme y motivarme para seguir siempre adelante.

A el profesor Enrique Millán, por su esfuerzo y dedicación constante, quien con sus conocimientos y experiencia, me ayudó a formarme como persona e investigadora.

A la Dra. Yris Martínez, al Dr. Ricardo Hernández, al Dr. Luigi Manfredy, al Msc. Carlos Rojas y el Lic. Eduylson Hernández por sus acertados comentarios y sugerencias durante la elaboración de mi tesis.

A mis amigos del laboratorio de Electroquímica: A Jesús Chacón, Rossi Vivas, Jesús Dimas, Florymar Escalona, Manuel Pulido, Omaira Contreras, Andri Contreras, Alexander Laguna, quienes me apoyaron en mi formación profesional.

## Resumen

La urea es un compuesto orgánico empleado ampliamente como fertilizante ya que es una fuente de nitrógeno para las plantas, componente necesario para su proceso de crecimiento. Esta sustancia, a pesar de ser soluble, no puede ser absorbido directamente por las plantas por lo que se hidroliza generando iones amonio en un proceso que puede durar de tres a cuatro días dependiendo de factores como la temperatura, humedad, contenido de materia orgánica, tipo de suelo y concentración de la enzima ureasa en el suelo, de allí que se hace necesario disponer de dispositivos que permitan monitorizar la cantidad de urea presente en el suelo que ha sido hidrolizada. En este trabajo se reporta el proceso de desarrollo y caracterización de un biosensor para la determinación de urea mediante la modificación de superficies de carbón vítreo empleando películas electrodepositadas del biopolímero quitosano, nanopartículas de oro y extractos de ureasa. Se evaluaron ureasas obtenidas apartir tanto de granos de soya (actividad de 14,41 U/mL) como de una solución comercial (actividad 1,86 U/mL) y se estudió el proceso de fijación de esta enzima a la superficie electródica para el desarrollo de biosensores amperométricos y potenciométricos, así como el proceso de ensamblaje del biosensor mediante técnicas electroquímicas y espectroscópicas lográndose desarrollar un biosensor potenciométrico de urea, encontrándose que la incorporación de nanopartículas de oro al transductor mejoran la respuesta del biosensor potenciométrico. Este biosensor presentó rango dinámico lineal 2,49 a 28,3 mM comparado con el sistema sin nanopartículas el cual presentó dos rangos de linealidad a 2,49 mM a 9,8 mM, y el otro a un rango de concentración de 12,19 mM a 28,3 mM.

## Tabla de contenido

|                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Capítulo I.....                                                                                 | 9  |
| Introducción.....                                                                               | 9  |
| I-1. El suelo e indicadores de su calidad.....                                                  | 9  |
| I-1.2. Indicadores de la calidad el suelo. ....                                                 | 11 |
| I-2. Las enzimas, su actividad y factores que afectan su actividad enzimática.....              | 12 |
| I-2.1. Enzima ureasa, características físico-químicas y factores que afectan su actividad. .... | 13 |
| I-2.2. Factores que afectan la actividad de la ureasa. ....                                     | 14 |
| I-2.4. Efecto de la enzima ureasa en la energía de activación de la hidrólisis de la urea. .... | 15 |
| I-3. La urea, el nitrógeno y el ciclo del nitrógeno. ....                                       | 17 |
| I-4. Sensores químicos. ....                                                                    | 20 |
| I-4.1. Biosensor amperométrico. ....                                                            | 21 |
| I-4.2. Biosensor potenciométrico. ....                                                          | 23 |
| I-6. Quitosano, caracterización y aplicaciones.....                                             | 25 |
| I-6.1. Aplicaciones del quitosano.....                                                          | 25 |
| Capítulo II .....                                                                               | 29 |
| Procedimiento experimental .....                                                                | 29 |
| II-1. Hipótesis. ....                                                                           | 30 |
| II-2. Objetivos.....                                                                            | 30 |
| General: .....                                                                                  | 30 |
| Específicos:.....                                                                               | 30 |
| II-3. Parte experimental. ....                                                                  | 31 |
| II-3.1. Laboratorios. ....                                                                      | 31 |
| II-3.2 Reactivos y solventes.....                                                               | 31 |
| II-3.3. Preparación de soluciones. ....                                                         | 32 |
| □ Solución de quitosano: .....                                                                  | 32 |
| □ Solución de ureasa:.....                                                                      | 33 |
| □ Reactivo de Nessler: .....                                                                    | 33 |
| II-4. Material biológico y procedimientos experimentales:.....                                  | 34 |
| II-4.1 Germinación de las semillas de soya. ....                                                | 34 |
| II-4.2. Extracción de la ureasa. ....                                                           | 34 |

|                                                                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| II-4.3. Purificación del extracto de ureasa. ....                                                                                                                                               | 35 |
| II-5. Determinación de la actividad de la ureasa. ....                                                                                                                                          | 35 |
| II-5.1. Método colorimétrico de Nessler.....                                                                                                                                                    | 35 |
| II-5.2. Método de Kandeler y Gerber modificado por Kandeler.....                                                                                                                                | 36 |
| II-5.3 Curva de calibración sencilla. ....                                                                                                                                                      | 37 |
| II-5.4. Curva de calibración estándar. ....                                                                                                                                                     | 37 |
| II-6. Sistema electroquímico. ....                                                                                                                                                              | 37 |
| II-6.1. Voltamperometría cíclica. ....                                                                                                                                                          | 39 |
| II-6.2. Microscopia óptica.....                                                                                                                                                                 | 39 |
| II-6.3. Potenciometría. ....                                                                                                                                                                    | 40 |
| II-7. Modificación de la superficie del electrodo de trabajo con quitosano. ....                                                                                                                | 40 |
| II-7.1. Inmovilización de la enzima ureasa comercial sobre el electrodo de carbón vítreo modificado con quitosano para las medidas amperométricas. ....                                         | 41 |
| II-7.2. Estudio electroquímico de la urea en superficies de carbón vítreo modificado con quitosano- ureasa.....                                                                                 | 41 |
| II-8. Modificación del electrodo de carbón vítreo con la enzima ureasa comercial y quitosano para las medidas potenciométricas. ....                                                            | 41 |
| II-8.1. Estudio potenciométricos de la urea en superficies de carbón vítreo modificado con quitosano- ureasa.....                                                                               | 42 |
| II-9. Modificación de la superficie del electrodo de trabajo con quitosano y nanopartículas de oro. ....                                                                                        | 43 |
| II-9.1. Modificación de la superficie del electrodo de trabajo con quitosano, nanopartículas de oro y ureasa comercial.....                                                                     | 44 |
| II-9.2. Estudios potenciométricos de la urea en superficies de carbón vítreo modificado con quitosano, nanopartículas de oro y ureasa comercial, para las medidas potenciométricas de urea..... | 45 |
| II-10. Modificación de la superficie del electrodo de trabajo con quitosano, nanopartículas de oro y extracto de ureasa para las medidas potenciométricas.....                                  | 45 |
| II-10.1. Estudios potenciométricos de la urea en superficies de carbón vítreo modificado con quitosano- nanopartículas de oro- extracto de ureasa.....                                          | 46 |
| Capítulo III.....                                                                                                                                                                               | 47 |
| Caracterización del elemento de reconocimiento.....                                                                                                                                             | 47 |
| III-1. Enzima.....                                                                                                                                                                              | 48 |
| III-1.1. Determinación de la actividad de la ureasa.....                                                                                                                                        | 48 |
| III-2 Caracterización del transductor.....                                                                                                                                                      | 51 |
| III-2.1 Transductor. ....                                                                                                                                                                       | 51 |

|                                                                                                                                                                            |                                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| III-2.2. Caracterización de la superficie de carbón vítreo (transductor) .....                                                                                             | 51                                   |
| III-2.2. Estudio electroquímico de la cupla redox hidroquinona/quinona sobre carbón vítreo (transductor).....                                                              | 52                                   |
| III-3.3. Optimización de la activación electroquímica .....                                                                                                                | 59                                   |
| Capítulo IV .....                                                                                                                                                          | 62                                   |
| Caracterización del sistema de inmovilización.....                                                                                                                         | 62                                   |
| IV-1. Soporte. ....                                                                                                                                                        | 62                                   |
| IV-1.1. Modificación de la superficie del electrodo de trabajo con quitosano. ....                                                                                         | 63                                   |
| Capítulo V .....                                                                                                                                                           | 70                                   |
| Ensamblaje del biosensor .....                                                                                                                                             | 70                                   |
| V-1. Biosensor amperométrico. ....                                                                                                                                         | 71                                   |
| V-1.1 Respuesta electroquímica de la urea utilizando el electrodo de carbón vítreo modificado con quitosano-ureasa, utilizando como mediador la especie hidroquinona. .... | 73                                   |
| V-2. Biosensor potenciométrico.....                                                                                                                                        | 74                                   |
| V-2.1. Superficies de carbón vítreo modificado con quitosano y ureasa comercial.....                                                                                       | 75                                   |
| V-3. Modificación de la superficie del electrodo de trabajo con quitosano y nanopartículas de oro. ....                                                                    | 80                                   |
| V-3.1. Respuesta potenciométrica de la urea con el electrodo modificado con quitosano, nanopartículas de oro y ureasa comercial. ....                                      | 84                                   |
| V-3.2. Respuesta potenciométrica de la urea con el electrodo modificado con quitosano, nanopartículas de oro y extracto de ureasa. ....                                    | 86                                   |
| Capítulo VI.....                                                                                                                                                           | 88                                   |
| Conclusiones.....                                                                                                                                                          | 89                                   |
| Recomendaciones.....                                                                                                                                                       | 90                                   |
| Anexo I-1.....                                                                                                                                                             | 91                                   |
| Anexo I-2.....                                                                                                                                                             | 99                                   |
| Anexo I-3.....                                                                                                                                                             | 100                                  |
| Bibliografía.....                                                                                                                                                          | <b>¡Error! Marcador no definido.</b> |

# Capítulo I

## Introducción

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

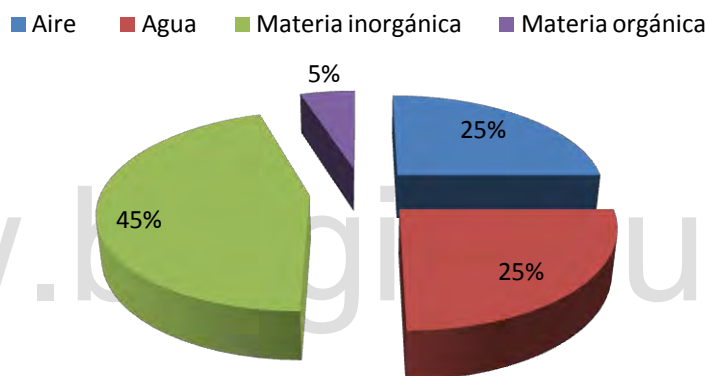


# Capítulo I

## Introducción

### I-1. El suelo e indicadores de su calidad.

El suelo es la capa más superficial de la corteza terrestre que resulta de la descomposición de las rocas por cambios bruscos de temperatura, por la acción del agua, del viento y de los seres vivos. Está constituido por un 45% de materia inorgánica (arena, limo y arcilla), un 25% de agua, un 25% de aire y un 5 % de materia orgánica (humus, raíces y organismos vivos como lombrices, insectos, algas, bacterias, hongos, nematodos, entre otros), entre los cuales se produce un intercambio continuo de moléculas mediante procesos químicos, físicos y biológicos (figura 1) <sup>(1)</sup>

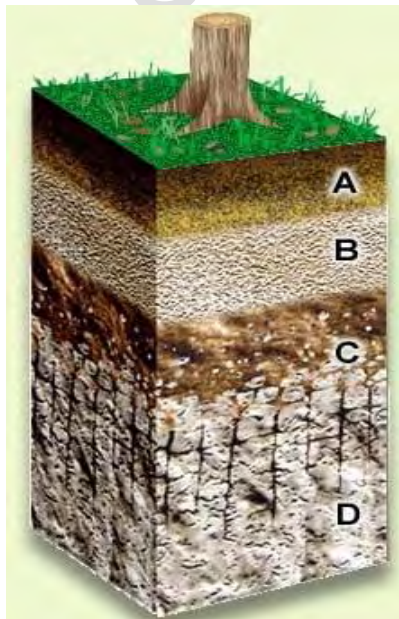


**Figura 1.** *Composición del suelo<sup>1</sup>.*

El punto de partida de la formación del mismo lo componen las rocas que se encuentran situadas en la superficie terrestre (en su mayoría rocas ígneas metamórficas y sedimentarias), las cuales mediante procesos distintos de meteorización y a través del tiempo son desintegradas y alteradas por acción de diversos agentes de naturaleza física, química y biológica. <sup>(2)</sup>

Durante la formación del suelo se van desarrollando diferentes capas denominadas horizontes (figura 2), que se distinguen por su composición, color, textura, adherencia y por la cantidad de materia orgánica que poseen. Típicamente tiene cuatro capas: <sup>[(3)- (4)]</sup>

- ❖ El horizonte A, horizontes minerales que se formaron en la superficie del suelo o en su defecto por debajo del horizonte O; corresponde a la zona del suelo en donde se cultiva (ya que es la primera capa) y se caracteriza por su blandura además de presentar un color oscuro, debido a la gran cantidad de materia orgánica o humus que contiene.
- ❖ El horizonte B, o subsuelo, se forma por debajo del horizonte A; es de un color claro ya que carece de materia orgánica y suelen acumular los nutrientes minerales, materiales arcillosos, óxidos e hidróxidos metálicos que se han lixiviado (lavado) del horizonte A.
- ❖ El horizonte C, constituido por material originario disgregado y alterado por la meteorización, puede tener rocas disueltas o dispersas sobre la roca madre en el que descansan las tres capas.
- ❖ El horizonte D, está formado por la roca madre o material rocoso que no ha presentado ninguna alteración química o física.



**Figura 2.** Horizontes del suelo.

La profundidad y la composición de estas capas, y en consecuencia la fertilidad del suelo, varían considerablemente en ambientes diferentes; pudiendo existir además por sobre el horizonte A un llamado horizonte O formado por hojarasca y otros materiales en descomposición.

### **I-1.2. Indicadores de la calidad el suelo.**

La calidad del suelo no puede medirse directamente, por lo que su estudio exige el empleo de indicadores que sean sensibles a alteraciones que puedan suponer un aumento o disminución de la misma, estos son una herramienta muy útil para simplificar y cuantificar fenómenos complejos y además proporcionan información valiosa sobre las propiedades físicas, químicas, biológicas, procesos y características del suelo. Para que estas propiedades sean consideradas indicadores deben cumplir las siguientes características:<sup>[5)-(6)]</sup>

- a) Describir los procesos del ecosistema.
- b) Integrar propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo.
- c) Reflejar los atributos de sostenibilidad que se quieren medir.
- d) Ser sensibles a variaciones de clima y manejo.
- e) Ser sensibles a los cambios en el suelo que ocurren como resultado de la degradación antropogénica y cuando sea posible, ser componentes de una base de datos del suelo ya existente.

#### **Indicadores físicos:**

Las propiedades físicas que se pueden considerar como indicadores de la calidad del suelo son aquellas que señalan la forma en que el suelo acepta, retiene y transmite agua a las plantas, la infiltración o el movimiento que tiene el agua dentro de los horizontes, como por ejemplo la textura, la estructura, densidad, estabilidad, profundidad y capacidad de almacenamiento.

#### **Indicadores químicos:**

Los indicadores químicos se refieren a los parámetros que afectan las relaciones suelo-planta, calidad del agua, capacidad amortiguadora del suelo, la disponibilidad de agua y nutrientes para las plantas, pH, conductividad eléctrica, capacidad de adsorción de

fosfatos, capacidad de intercambio de cationes, cambios en la materia orgánica, el nitrógeno total y el nitrógeno mineralizable.

### **Indicadores biológicos y bioquímicos**

Los indicadores biológicos se refieren a los factores que afectan la calidad del suelo, corresponden a la abundancia y subproductos de microorganismos y macroorganismos, incluidos bacterias, hongos, nematodos, lombrices, anélidos y artrópodos.

Entre los parámetros bioquímicos se incluyen las variables relacionadas con la actividad microbiana y más específicamente, con la actividad de enzimas implicadas en los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno, azufre y fósforo. Estas actividades enzimáticas proporcionan información tanto del estado microbiológico del suelo como sobre sus propiedades fisicoquímicas, siendo indicadores tempranos de cambios en la calidad del suelo.

### **I-2. Las enzimas, su actividad y factores que afectan su actividad enzimática.**

Los microorganismos son los componentes más importantes en el suelo, son responsables de la transformación de la materia orgánica e inorgánica, además intervienen en diferentes procesos (humificación, amonificación, nitrificación y fijación del nitrógeno, entre otros) y producen enzimas como la amilasa, proteasa, catalasa y ureasa, entre otras.<sup>[(7)-(8)]</sup>

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica encargadas de catalizar un tipo específico de reacción química que inicialmente se producen a una velocidad muy lenta; pero que en presencia de la enzima, son cinéticamente favorables, por lo que la velocidad de la reacción aumenta significativamente. Este aumento en velocidad está asociado a la formación del complejo enzima-sustrato, resultado que provoca la disminución de la energía de activación que es necesaria para poner en marcha la reacción de conversión del sustrato en su producto.<sup>[(9)-(10)]</sup>

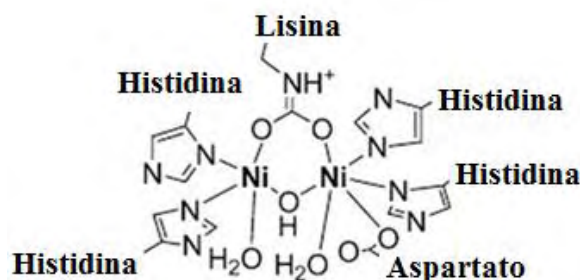
La actividad de las enzimas del suelo se mide cuantificando el incremento de la velocidad de reacción, ésta es fuertemente dependiente de la temperatura, debido a que cada enzima presenta una temperatura óptima en donde se observa su valor máximo de

actividad; incrementos de temperatura muy altos pueden conducir a la desnaturalización de la enzima <sup>[(11)-(12)]</sup>

Otro de los factores que afectan la actividad enzimática es el pH, ya que dependiendo de la enzima, unas pueden tener mayor actividad a un pH ácido que a un pH básico, como por ejemplo la proteína pepsina, la cual presenta un mayor grado de actividad a un pH=2, mientras que la mayoría de las enzimas, entre ellas la ureasa, presentan un pH óptimo cerca de 7. <sup>(12)</sup>

### **I-2.1. Enzima ureasa, características físico-químicas y factores que afectan su actividad.**

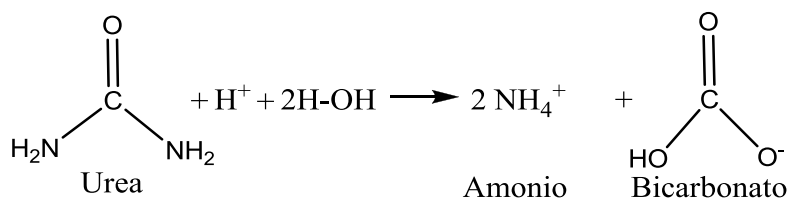
Las enzimas se dividen en 6 grupos principales: oxirreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. Perteneciendo la ureasa al grupo de la hidrolasa; esta es una metaloenzima de níquel (figura 3) que cataliza la hidrólisis de la urea a dióxido de carbono y amonio  $10^{14}$  veces más rápido. <sup>(13)</sup>



**Figura 3.** Estructura de la ureasa.

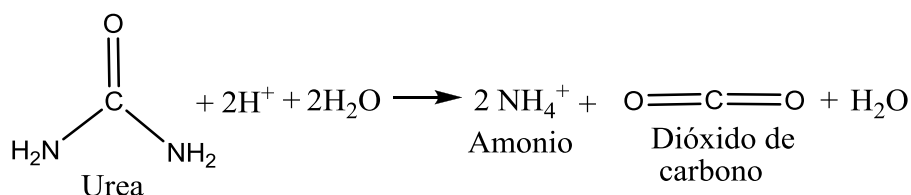
Esta enzima se encuentra principalmente en semillas de plantas, microorganismos e invertebrados y su principal función es actuar sobre los enlace C-N de la urea. <sup>(14)</sup>

La reacción de hidrólisis de la urea depende del pH del suelo, así en suelos con un pH mayor o igual a 6,3 la hidrólisis sigue el siguiente proceso:



**Ecuación 1.** *Hidrólisis de la urea a un pH mayor o igual a 6,3.*

Mientras que si el pH del suelo es menor de 6,3, la hidrólisis sigue el siguiente proceso: (9)



**Ecuación 2.** *Hidrólisis de la urea a un pH menor de 6,3.*

El origen de la ureasa es básicamente microbiana y su actividad es extracelular, esta actividad es el resultado de la reserva o acumulación de la misma, excreción de las raíces y la proliferación de microorganismos con la capacidad de sintetizarla; la misma se ve afectada por ciertos factores que incluyen: la concentración del sustrato, nivel de agua, temperatura, pH, entre otros, los cuales provocan una disminución o un aumento considerable en su actividad.

### **I-2.2. Factores que afectan la actividad de la ureasa.**

Existen un conjunto de condiciones o parámetros que modifican la respuesta de la enzima ureasa en el suelo, entre ellos se tienen:

#### **Concentración de la urea**

La literatura<sup>[(1)-(15)]</sup> muestra que la actividad enzimática aumenta con el incremento de la concentración de urea, hasta que la cantidad adicionada es suficiente para saturar la enzima.

#### **Humedad del suelo**

La literatura existente sobre el efecto de la humedad del suelo en la actividad de la ureasa es contradictoria, ya que algunos investigadores defienden la teoría bajo la cual la actividad de la ureasa no se ve afectada por la humedad del suelo<sup>(16)</sup>, mientras que otros

investigadores indican que aumenta <sup>(17)</sup> o que disminuye<sup>[(18), (19)]</sup> por el incremento de la humedad en el suelo.

### **Temperatura**

La actividad de la ureasa se incrementa considerablemente con el aumento de la temperatura desde 10°C hasta 70°C y disminuye con un aumento adicional de temperatura por encima de los 70°C, hasta un punto en el que la misma se desnaturaliza. <sup>(1)</sup>

### **pH**

Algunos estudios <sup>(20)</sup> han indicado que el pH óptimo para la ureasa en el suelo es entre 6,5 y 7,0; mientras que otros <sup>(21)</sup> han indicado que el pH óptimo está entre 8,8 y 9,0.

### **Secado y rehumedecimiento**

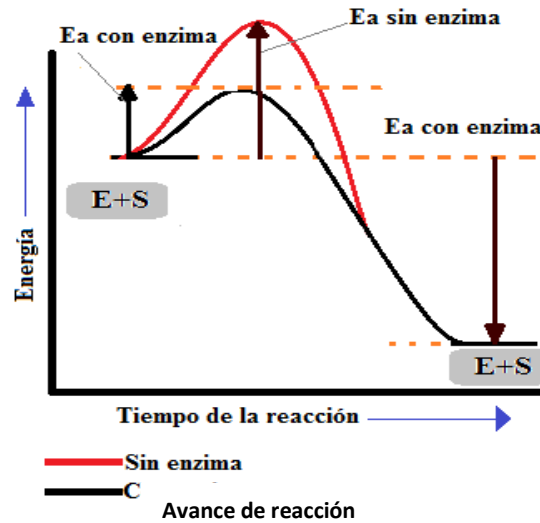
La actividad de la ureasa no se ve afectada en muestras de suelos secadas al aire, sin embargo, si el suelo es rehumedecido e incubado, la actividad de la enzima disminuye significativamente. <sup>(1)</sup>

### **Materia orgánica**

La actividad de la ureasa puede aumentar por la adición de materia orgánica que promueve la actividad microbiana, debido a que la ureasa en el suelo es producida por los microorganismos. <sup>(1)</sup>

## **I-2.4. Efecto de la enzima ureasa en la energía de activación de la hidrólisis de la urea.**

La hidrólisis de la urea puede ocurrir espontáneamente en presencia o ausencia de un catalizador, originando los mismos productos. Sin embargo a esta reacción cuando se le incorpora la enzima ureasa, se produce un cambio en la energía de activación disminuyéndola notoriamente de 30 a 11kcal/mol, por lo que acelera la reacción  $10^{14}$  veces.

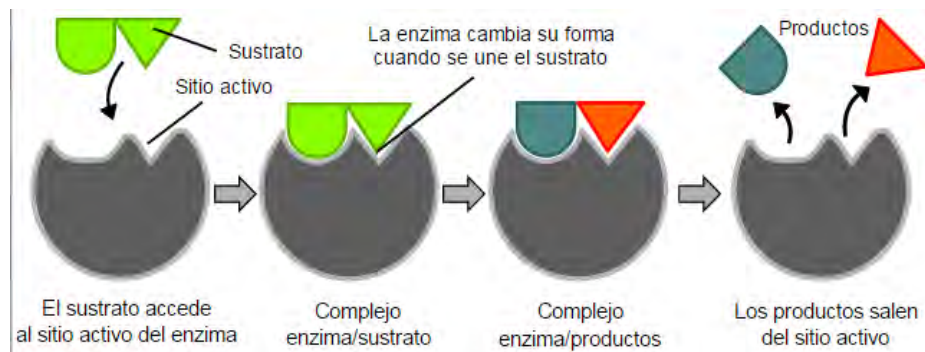


**Figura 4.** Diagrama de estado de transición

La reducción en la energía de activación observada en la figura 4 se produce por la formación del complejo enzima-sustrato, debido a que las enzimas tienen la capacidad para manejar millones de moléculas de sustrato por segundo, lo que provoca la aceleración de la velocidad de reacción sin alterar su equilibrio. <sup>[(22)-(1)]</sup>

El mecanismo de reacción del complejo enzima - sustrato se observa en la (figura 5), dicho mecanismo postula que el sustrato produce cambios en la conformación de la enzima ya que se le considera como una estructura flexible, por lo que el sitio activo cambia su conformación estructural por la interacción con el sustrato, provocando la alineación apropiada de los grupos funcionales de la enzima para favorecer un mejor enlace entre la enzima y el sustrato. <sup>(23)</sup>



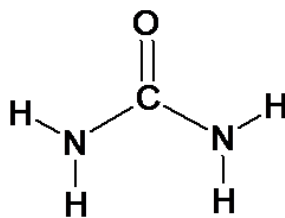


**Figura 5.** Mecanismo de ajuste inducido del complejo enzima-sustrato. <sup>(23)</sup>

### I-3. La urea, el nitrógeno y el ciclo del nitrógeno.

La urea (figura 6) es una sustancia higroscópica capaz de absorber agua de la atmósfera, presenta un ligero olor a amoníaco y es producida por algunos seres vivos como medio de eliminación del amoníaco, el cual es altamente tóxico para ellos. En los animales se encuentra en la sangre, orina, bilis y en el sudor.

La molécula de este compuesto posee dos átomos de nitrógeno, uno de ellos procede del aspartato y el otro se incorpora en forma de  $\text{NH}_4^+$ , a su vez el átomo de carbono es aportado por una molécula de bicarbonato. <sup>(24)</sup>



**Urea**

**Figura 6.** Molécula de urea.

Los principales usos de la urea son como (figura 7):

- ❖ Fertilizante: se aplica al suelo y proporciona un alto contenido de nitrógeno, esencial para el metabolismo de la planta ya que se relaciona directamente con la cantidad de tallos y hojas, las cuáles absorben la luz para la fotosíntesis.
- ❖ Industria química y plástica: se encuentra presente en adhesivos, plásticos, resinas, tintas, productos farmacéuticos y acabados para productos textiles, papel y metales.

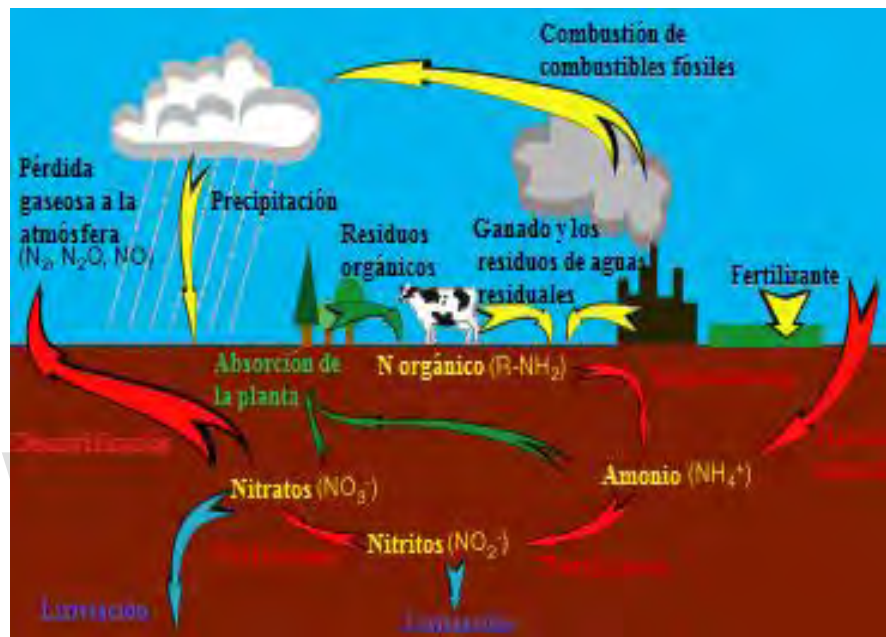
- ❖ Producción de resinas: estas resinas tienen varias aplicaciones en la industria, como por ejemplo la producción de madera aglomerada. También se usa en la producción de cosméticos y pinturas.
- ❖ Suplemento alimentario para ganado: se mezcla en el alimento del ganado y aporta nitrógeno, el cuál es vital en la formación de las proteínas.



**Figura 7.** *Aplicaciones de la urea.*

En la molécula de urea, así como en muchas otras sustancias, se encuentra el nitrógeno; este es un elemento increíblemente versátil que existe en forma inorgánica y orgánica, a la vez que en diferentes estados de oxidación, es esencial para el metabolismo, ya que forma parte de muchas moléculas de gran importancia biológica como es el caso del ADN, ARN y de las proteínas; la mayor cantidad de este compuesto que se encuentra en la atmósfera no está al alcance para el uso de los organismos, lo que provoca una limitante en el crecimiento de las plantas y la acumulación de biomasa, esto se debe a que es un elemento poco reactivo, por lo que no puede ser asimilado por la mayoría de las formas de vida, ya que para que pueda ser asimilado es necesario que el gas se combine con otros elementos y se convierta en una forma química disponible como el amonio, el nitrato o el nitrógeno orgánico.

El movimiento del nitrógeno entre la atmósfera, la biosfera y la geósfera en sus diferentes formas está descrito en la figura 8, en donde las flechas amarillas indican las fuentes humanas de nitrógeno para el ambiente, las flechas rojas indican las transformaciones microbianas del nitrógeno, las flechas azules indican las fuerzas físicas que actúan sobre el nitrógeno y las flechas verdes indican los procesos naturales y no microbianos que afectan la forma y el destino del nitrógeno.



**Figura 8.** Movimiento del nitrógeno entre la atmósfera, la biosfera y la geósfera. <sup>(25)</sup>

Existen cinco procesos principales en el ciclo del nitrógeno: la fijación del nitrógeno, la toma de nitrógeno por las plantas, la mineralización del nitrógeno, la nitrificación y la desnitrificación. Los microorganismos, en especial las bacterias, participan de manera trascendental en las transformaciones de este elemento. En la figura 8 se observa la secuencia del ciclo, en donde el nitrógeno gaseoso puede ser reducido a amonio, ya sea por procesos químicos o por bacterias a través de la fijación de nitrógeno, el amonio puede ser incorporado en el material biológico, aunque cuando se encuentra especialmente en los suelos, se oxida de forma secuencial a nitrito ( $NO_2^-$ ) y nitrato ( $NO_3^-$ ) por dos especies distintas de bacterias. El nitrato es posible utilizarlo como fuente de nitrógeno en el suelo, para el crecimiento de las plantas; éste se puede convertir en nitrógeno gaseoso con la siguiente secuencia: nitrato, nitrito, óxido nítrico, óxido nítrico

y por último a nitrógeno gaseoso, a través de un proceso denominado desnitrificación, el cual se basa en un proceso anaeróbico llevado a cabo por la bacteria que desnitrifica. [(25)-(26)]

Este ciclo del nitrógeno es uno de los más importantes en comparación con los demás nutrientes que se encuentran en los ecosistemas terrestres, siendo adicionalmente uno de los más difíciles de estudiar debido a la gran variedad de formas en que se presenta el nitrógeno, además de que en su interconversión se encuentran implicados muchos organismos. [(27)-(28)]

Debido a la importancia del nitrógeno en los suelos es relevante evaluar y cuantificar las especies nitrogenadas que existen en el mismo por medio de diferentes métodos de estudios, uno de ellos es mediante la utilización de sensores químicos que son específicos a un sustrato, los cuales son de gran utilidad debido a que no solo proporcionan información valiosa acerca de un sistema de reacción en específico, sino que presentan una alta selectividad y ofrecen tiempos de respuesta cortos.

#### **I-4.Sensores químicos.**

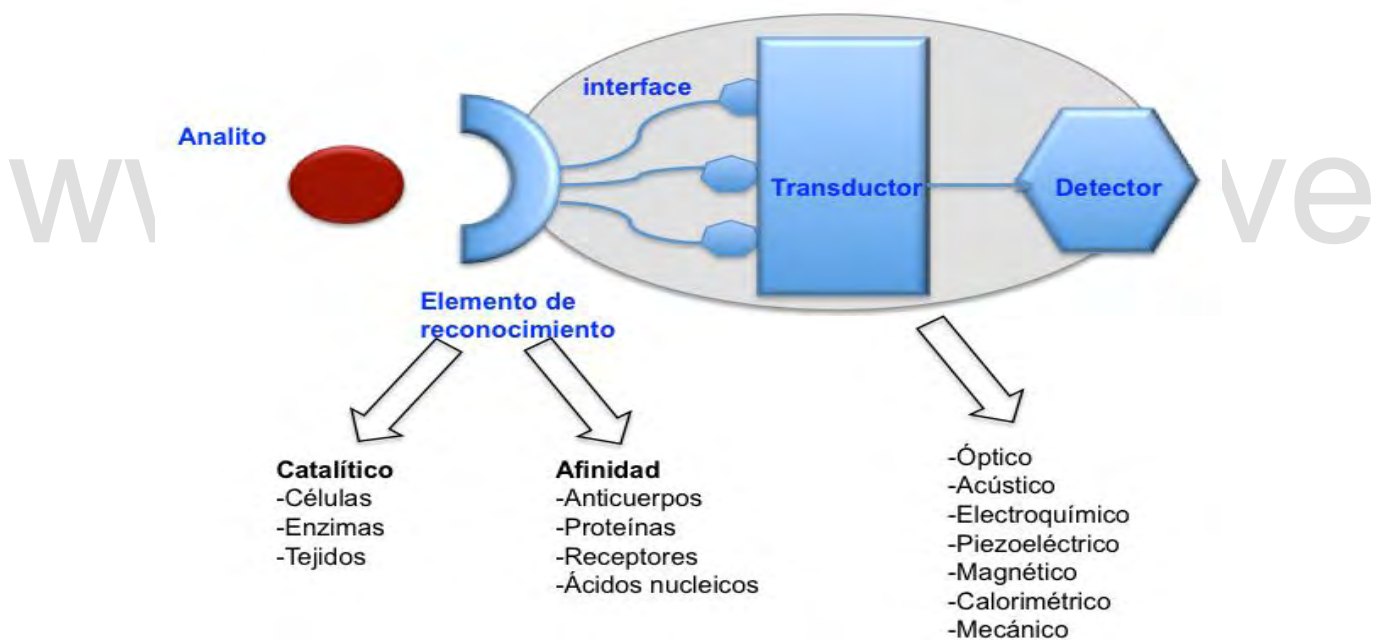
Los sensores químicos son dispositivos que transforman información química en una señal analítica útil y representan una nueva clase de instrumentación analítica, caracterizada por ser miniaturizables, de bajo costo, simples de usar y son capaces de generar información (idealmente) en tiempo real. (29)

De manera general se podría definir a un sensor químico como un dispositivo capaz de responder de manera inequívoca a un analito en el seno de una muestra compleja. Estos constan de dos componentes básicos: un elemento de reconocimiento que interactúa con el analito, y un transductor, que permite convertir esa interacción en una señal analítica. Si el transductor es un electrodo, entonces el sensor será electroquímico y cuando el elemento de reconocimiento involucra especies biológicas se estará en presencia de un biosensor. (30)

Dentro de las principales características de un biosensor resaltan su selectividad y sensibilidad, además de permitir el análisis de sustancias en tiempo real, de forma puntual (directa) y continua; aunado a la alta especificidad de los mismos gracias a las moléculas biológicas que se emplean en su construcción. Es importante destacar que estos dispositivos presentan una serie de limitaciones, entre las que resalta la inestabilidad de los elementos

de detección biológica, debido a que estos compuestos pueden perder su actividad por el cambio de pH y temperatura (entre otras variables), además que los rangos dinámicos de concentración no son tan amplios como los de otras técnicas analíticas.

Actualmente existe una gran variedad de biosensores en los cuales se combinan diferentes componentes biológicos (enzimas, ácidos nucleicos, anticuerpos, entre otros) con un transductor que puede ser óptico, acústico, piezoeléctrico, electroquímico entre otros (figura 9) <sup>(31)</sup>. Este último transforma la señal producida por la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento en una señal electroquímica, la cual puede ser procesada a través de técnicas conductimétricas, amperométrica, potenciométricas e impedimétricas, en función de si detectan cambios en la conductividad, en la corriente generada, en el potencial o en la impedancia. <sup>(32)</sup>



**Figura 9.** Componentes de un sensor.

#### **I-4.1. Biosensor amperométrico.**

Son dispositivos que consisten en la aplicación de un potencial constante a un electrodo de trabajo en el tiempo, empleando un electrodo auxiliar o contraelectrodo para completar el sistema de la celda electroquímica. Se basan en la relación lineal que existe entre la concentración de un analito y la corriente eléctrica que se genera al oxidarse o reducirse el analito sobre la superficie de un electrodo. <sup>(33)</sup>

Un ejemplo de estos biosensores son los desarrollados por Goncalves y colaboradores<sup>(34)</sup> los cuales desarrollaron un biosensor amperométrico de urea basado en el atrapamiento de la enzima ureasa en películas de polipirrol; la electropolimerización del pirrol fue realizado por voltametría cíclica en una ventana de potencial de -1V a 1V realizando 10 ciclos. Estos investigadores reportaron que el potencial de oxidación se desplazaba a valores más negativos (-0,28 a -0,33 V vs SCE) a medida que se incrementaba la concentración de urea, observando también una eficacia relativamente alta para detectar urea en una rango de concentración de 0,5 a 3 mM, una sensibilidad de  $2,41 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$  y un tiempo de respuesta de 3 min.

Igualmente, Godjevargova y colaboradores<sup>(35)</sup> desarrollaron un biosensor amperométrico de urea inmovilizando la enzima ureasa en membranas de polímeros nanoestructuradas. La inmovilización de la enzima fue obtenida mediante la incorporación de nanopartículas de rodio recubiertas de quitosano e incorporadas a membranas de un copolímero previamente modificado, el biosensor presentó un comportamiento lineal en un intervalo de concentración de urea de 1,6 a 8,2 mM, sensibilidad de  $3,1927 \mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ , coeficiente de correlación lineal de 0,998, límite de detección de urea de 0,5mM y un tiempo de vida funcional de aproximadamente 10 días. Esta buena sensibilidad y rápida respuesta a bajas concentraciones de urea se debe a la presencia del quitosano y a las nanopartículas de rodio en la membrana del polímero, los cuales permitieron la inmovilización de la enzima ureasa de una manera efectiva, generando de esta forma una eficiente transferencia de electrones entre el sitio activo de la enzima y el electrodo.

Posteriormente, estos investigadores<sup>(36)</sup> reportaron el desarrollo de un nuevo biosensor amperométrico para la determinación de urea. Este se preparó electrodepositando rodio en una membrana de un polímero e inmovilizando la enzima ureasa, estos investigadores prepararon tres tipos de membranas mediante voltametría cíclica, aplicando un barrido de potencial de -0,8 a 0,2 V al electrodo de trabajo y variando el número de ciclos de deposición; obteniendo que la membrana preparada con un menor número de ciclos fue la más activa y sensible con respecto al ion amoniac; además se encontró que el potencial óptimo de oxidación fue de 0,60 V; el sensor mostró un límite de detección de

0,05 mM de urea, una alta sensibilidad de  $1,85 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ , con un tiempo de respuesta de 15 s, buena reproducibilidad y un tiempo de vida de aproximadamente 27 días.

#### **I-4.2. Biosensor potenciométrico.**

Un biosensor potenciométrico se puede definir como un dispositivo que incorpora un elemento de detección biológica conectado a un transductor de potencial electroquímico <sup>(37)</sup>, el componente biológico responde a la presencia del analito de interés el cual puede sufrir una reacción de óxido-reducción que da como resultado una señal que puede ser amplificada, almacenada y registrada; funcionan bajo condiciones de equilibrio y el potencial del electrodo de trabajo se mide versus un electrodo de referencia. Estos biosensores son de un costo moderado por el alto precio de las enzimas y presentan un tiempo de respuesta en segundos.

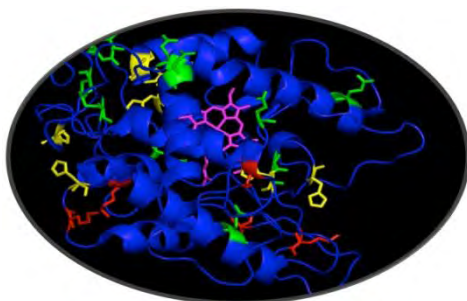
Un ejemplo de estos biosensores fueron los estudiados por Malitesta y colaboradores <sup>(38)</sup>, quienes desarrollaron un biosensor potenciométrico simple y novedoso para la detección de urea, el cual fue preparado mediante la deposición de ureasa en un electrodo de carbón vítreo seguido de la inmovilización de una película de un polímero electrosintetizado de polifenilendiamina; este biosensor presentó un comportamiento Nernstiano en un rango de concentraciones de  $10\mu\text{M}$  a  $1\text{mM}$ , mostrando una rápida respuesta y buena sensibilidad. Igualmente D'Souza y colaboradores <sup>(39)</sup> reportaron buenos resultados inmovilizando la ureasa en una membrana compuesta por alcohol polivinílico (PVA) y poli(acrilamida) (PAA), el rendimiento del biosensor se controló usando una celda de flujo donde la membrana se mantuvo en conjugación con el electrodo selectivo de amonio y la urea se añadió como sustrato en un medio tampón de fosfato. El biosensor mostró una buena sensibilidad en un rango de concentración de urea ( $1\text{-}1000\text{mM}$ ) con un tiempo de respuesta de 120 s. Este biosensor pudo ser reutilizado 8 veces con más de 90% de precisión (conservado en tampón fosfato que contiene ditiotreitól,  $\beta$ -mercaptoetanol y glicerol, por un periodo de dos meses sin pérdida significativa de la actividad de la enzima).

Así mismo, Pancha y colaboradores <sup>(40)</sup> desarrollaron un biosensor potenciométrico de urea inmovilizando la enzima ureasa por atrapamiento en una matriz de un polímero de poli (sulfonato de carbamoilo) y polietilenimina, en la superficie de un electrodo dispuesto con una membrana sensitiva de iones amonio, este sistema respondió rápidamente (30-40 s)



y de una manera estable para diferentes concentraciones de una solución de urea; reportándose, un límite de detección de  $2,5 \times 10^{-5}$  mol/L, una pendiente media en el intervalo lineal de  $51,7 \pm 0,5$  mV/década con un alto grado de reproducibilidad, una buena sensibilidad para detectar bajos niveles de urea en muestras de leche. También se probó la estabilidad del biosensor almacenándolos a dos temperaturas diferentes  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ , encontrándose que el biosensor que presentaba un tiempo de vida útil más amplio fue el almacenado a  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Recientemente se ha venido implementando el uso de quitosano como soporte para el desarrollo de biosensores enzimáticos, en este tipo de biosensores catalíticos el elemento de reconocimiento es una o varias enzimas, las cuales usualmente son ancladas o unidas al transductor mediante un soporte el cual puede ser orgánico o inorgánico, en la figura 10 se muestra la estructura tridimensional de una enzima en la que se observan los diversos grupos químicos que están expuestos en la superficie, como por ejemplo: grupos carboxilos, aminos, entre otros, que pudieran ser empleados para la inmovilización de la enzima al soporte o directamente al transductor <sup>(41)</sup>. Esta inmovilización consiste en restringir completa o parcialmente los grados de libertad de la enzima por su unión a un soporte. Este proceso puede incrementar la estabilidad conformacional de dicha enzima, además de su productividad por la capacidad de reutilización debido a que son fácilmente separadas de los productos, sin embargo esta técnica presenta algunos inconvenientes relacionados con la actividad enzimática, problemas difusionales, entre otros <sup>(42)</sup>.



**Figura 10.** Estructura tridimensional de una enzima.

En esta investigación se iniciaron los estudios para el desarrollo de un biosensor para detectar urea en suelos, utilizando como elemento de reconocimiento la enzima ureasa,



la cual es inmovilizada de distintas formas sobre superficies electrónicas de carbón vítreo (transductor) y empleando películas de quitosano como soporte.

## I-6. Quitosano, caracterización y aplicaciones.

El quitosano (figura 11) es un polisacárido semicristalino derivado de la quitina, insoluble en agua, pero soluble en medio ácido. Es uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza y es considerado como el más versátil por su amplio uso. Está formado por monómeros de D-glucosamina, formando enlaces glicosídicos de tipo  $\beta(1-4)$ , se caracteriza por su alto contenido de nitrógeno, presente en la forma de grupos aminos. <sup>(43)</sup>

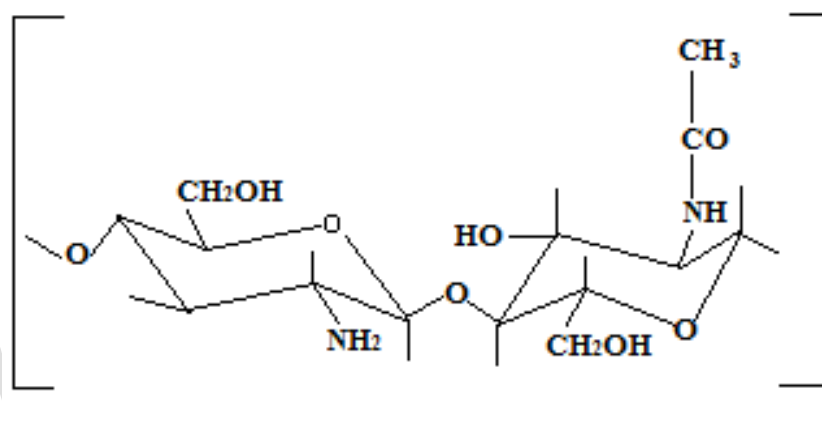


Figura 11. Estructura del quitosano.

### I-6.1. Aplicaciones del quitosano.

El quitosano tiene muchas aplicaciones en la industria, principalmente en la elaboración de cosméticos de cuidado del cabello, fabricación de cápsulas para adelgazar, como aditivo bactericida en jabones, champús, y cremas, en la farmacéutica y en aplicaciones biomédica, este tipo de derivado es generalmente útil como un portador para medicamentos contra el cáncer, para la producción de gasas, vendajes tratados con el biopolímero y como crema bactericida para quemaduras. <sup>(44)</sup>

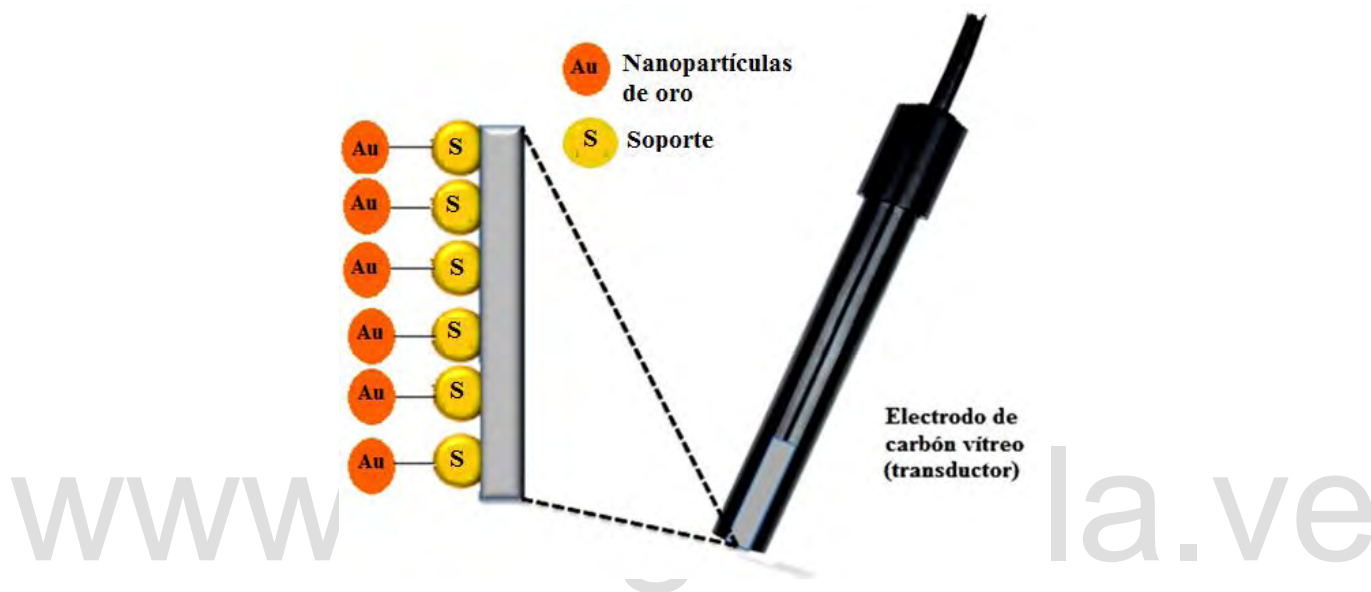
La literatura <sup>(45)</sup> muestra que se han utilizado películas de quitosano para la liberación controlada de fármacos, proteínas o en la agricultura, recubriendo las semillas para que se conserven durante el almacenamiento y actuando como un agente fungicida para la protección de las plantas, ya que inhibe el crecimiento de bacterias y estimula sus

defensas naturales. Por último, también es utilizado como soporte para la inmovilización de enzimas sensibles a un sustrato específico; un ejemplo de esto es la preparación de biosensores para la detección de fenoles en aguas basado en la inmovilización de la enzima tirosinasa y sensores para la detección de urea. [(45)-(44)]

Estos biosensores se pueden elaborar con innumerables enzimas dependiendo de lo que se quiera determinar, así Machado y colaboradores <sup>(46)</sup> reportaron un biosensor potenciométrico basado en la inmovilización de ureasa sobre una membrana de quitosano por cuatro procedimientos distintos, encontrando que la adsorción de la enzima seguida por reticulación del material polimérico con una solución acuosa diluida de glutaraldehído generó un biosensor con un intervalo de linealidad de  $10^{-4}$  a  $10^{-2}$  M, una pendiente de hasta 56 mV/década, un tiempo de vida de dos meses y un tiempo de respuesta de 30s. Así mismo, Mulyasuryani y colaboradores <sup>(47)</sup> desarrollaron un biosensor potenciométrico de urea, inmovilizando la enzima ureasa por absorción en una membrana de quitosano y empleando un pH-metro como transductor, el estudio reportó que el rendimiento del biosensor es afectado por el pH y el grosor de la membrana de quitosano, encontrándose un mejor rendimiento a un pH de 7,3 y 0,21 mm de espesor de membrana, estos autores reportaron límite de detección de 0,073 ppm, un tiempo de respuesta de 280 s, un rango de concentración de urea de 0,1 hasta 6,0 mg/L y una eficiencia para la medida de 32 muestras con una precisión de 94-99%

Una de las maneras de mejorar las respuestas de estos biosensores es a través del uso o la incorporación de nanomateriales tanto en el transductor como en el sistema soporte (figura 12), la literatura <sup>(48)</sup> muestra que estas nanopartículas mejoran la sensibilidad y selectividad del biosensor debido a su capacidad para absorber proteínas sin que se vea afectada su actividad biológica, incrementando la interacción con los centros activos de las enzimas y facilitando el transporte de electrones hacia la superficie del electrodo, aumentando así la sensibilidad de los biosensores, razón por la cual están siendo ampliamente utilizadas en esta área. Así, por ejemplo, Pingarrón y colaboradores <sup>(49)</sup> reportaron la fabricación de un sensor para la determinación de metionina en muestras reales y en un péptido farmacéutico basado en metionina, en el que las nanopartículas de oro son inmovilizadas sobre un electrodo de pasta de carbono previamente modificado con

una monocapa de cisteamina, los resultados obtenidos muestran que las nanopartículas de oro representa un excelente material para la determinación de metionina, generando un biosensor para la detección de metionina en productos farmacéuticos que contienen varias vitaminas, aminoácidos, vitaminas y otros compuestos. Este biosensor mostró una buena reproducibilidad, un límite de detección de  $5,9 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$  y un rango lineal de  $1,0 - 100 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$  (49).



**Figura 12.** Biosensor modificado con nanomateriales.

Por otro lado, Raj y colaboradores (50) desarrollaron un biosensor para la determinación de glucosa basado en el empleo de nanopartículas de oro autoensambladas a los grupos tioles de una matriz tridimensional del tipo sol-gel. Obteniéndose una excelente sensibilidad y un límite de detección de 50 nM. De igual manera Gong y colaboradores (51) desarrollaron un biosensor amperométrico de urea basado en la inmovilización covalente de la enzima ureasa en un electrodo fabricado por la deposición de nanopartículas de oro sobre superficies electrónicas de óxido de indio y estaño (ITO) recubiertas con un poliéster hiperramificado. Este biosensor enzimático mostró un alto grado de inmovilización de la ureasa, una respuesta lineal a la concentración de urea de 0,01 a 35 mM, una sensibilidad de 7,48 nA/mM y un tiempo de respuesta de 3 s. Este nuevo tipo de biosensor ha demostrado un rendimiento superior a los reportados en la literatura, una vida útil más larga, un amplio rango de detección y un tiempo de respuesta más corto.

Por otro lado, Fatibello-Filho y colaboradores <sup>(52)</sup> determinaron clindamicina usando un electrodo de carbón vítreo modificado con óxido de grafeno y nanopartículas de oro dentro de una película de quitosano reticulado con epíclorhidricina, el comportamiento de la clindamicina se estudió utilizando la técnica de voltametría cíclica y voltametría de onda cuadrada, con esta última, se logró un rango lineal de concentración de  $9,5 \times 10^{-7}$  a  $1,4 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>, con un límite de detección de  $2,9 \times 10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup>, los resultados demostraron que el uso de las nanopartículas de oro y el óxido de grafeno incorporado dentro de la película de quitosano fue primordial para el aumento de la sensibilidad de los electrodos modificados, además de mostrar tiempos de respuesta cortos, estabilidad a largo plazo, aplicabilidad en un rango amplio de concentraciones y bajo costo.

En el caso particular de Venezuela la investigación en el desarrollo de biosensores ha sido limitada a centros o grupos de investigación en las universidades autónomas y en el IVIC, aunque no se dispone de información sobre el desarrollo de biosensores con aplicaciones en el área de suelos de uso agrícola, a pesar de la gran demanda de agroquímicos y de necesidades reales de evaluar la fertilidad y productividad de suelos para la siembra; es por ello que en el grupo de Electroquímica y el LIAQIA se ha venido estableciendo una línea de investigación en el desarrollo de métodos de caracterización de suelos y el desarrollo de electrodos modificados para la determinación de elementos pesados, actividad enzimática y biosensores de diversos analito en este tipo de matriz. En este trabajo en particular la importancia radica en la necesidad de disponer de sistemas para la detección y cuantificación de urea, ya sea de manera puntual o en sistemas continuo, dado que la misma, a ciertas concentraciones, puede llegar a ser tóxica y su utilización como fertilizante en suelos puede acarrear ciertos problemas, como por ejemplo la pérdida del compuesto debido a que cuando se aplica en la superficie del suelo, su volatilización es muy común, ya que los iones amonio de la hidrólisis de la urea, pueden convertirse en amoniaco provocando grandes pérdidas del mismo <sup>(53)</sup>, generando de esta forma una reducción en el rendimiento del cultivo.

## Capítulo II

# Procedimiento experimental

## **II-1. Hipótesis.**

La modificación de la superficie de carbón vítreo con quitosano, nanopartículas de oro e inmovilización directa de la enzima ureasa, debería permitir desarrollar un electrodo selectivo para detectar urea en solución, posibilitando el ensamblaje de un biosensor de urea.

## **II-2. Objetivos.**

### **General:**

- Desarrollar electrodos de carbón vítreo modificados con quitosano, nanopartículas de oro y ureasa y evaluar mediante técnicas electroquímicas el contenido de urea en solución

### **Específicos:**

- Estudiar el proceso de extracción, purificación y caracterización de la enzima ureasa a partir de granos de soya y/o garbanzos y caracterizar la actividad enzimática de los extractos.
- Evaluar el proceso de modificación superficial de electrodos de carbón vítreo con quitosano y nanopartículas de oro.
- Evaluar la inmovilización de ureasa sobre películas de quitosano y su posterior incorporación a electrodos de carbón vítreo
- Evaluar las respuestas potenciométricas y voltamperométricas de electrodos de carbón vítreo sin modificar y modificados, a diferentes concentraciones de urea bajo medios tamponados.

## II-3. Parte experimental.

### II-3.1. Laboratorios.

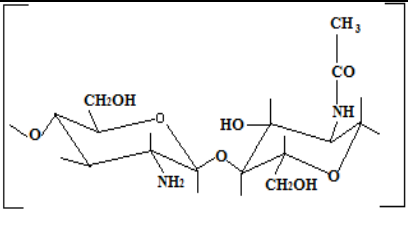
Los experimentos fueron realizados entre el laboratorio Electroquímica y el Laboratorio de Investigación en Análisis Químico, Industriales y Agropecuario (LIAQIA) de la Universidad de los Andes.

### II-3.2 Reactivos y solventes.

Las experiencias se realizaron con reactivos de grado analítico sin tratamiento previo y las soluciones se prepararon con agua de  $18 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$ , los reactivos utilizados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1. Características de los reactivos empleados para el desarrollo del trabajo experimental

| Nombre                     | Fórmula                                                      | Marca                     | Pureza                       |
|----------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| Acetona                    | $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$                               | Sigma-Aldrich             | 99,5%                        |
| Hidroquinona               | $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$                             | Sigma                     | 99%                          |
| Fosfato diácido de sodio   | $\text{NaH}_2\text{PO}_4$                                    | Riedel- de Haen           | 98%                          |
| Fosfato monoácido de sodio | $\text{Na}_2\text{HPO}_4$                                    | Scharlau                  | 98%                          |
| Hidróxido de sodio         | $\text{NaOH}$                                                | Sigma-Aldrich             | 99%                          |
| Ioduro de potasio          | $\text{KI}$                                                  | Merck                     | 99%                          |
| Ácido acético              | $\text{CH}_3\text{COOH}$                                     | Prolabo                   | Glacial                      |
| Nitrógeno                  | $\text{N}_2$                                                 | AGA                       | UAP                          |
| Cloruro de amonio          | $\text{NH}_4\text{Cl}$                                       | Merck                     | 99,8%                        |
| Urea                       | $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$                              | BDH                       | 99%                          |
| Ureasa                     | -----                                                        | Merck                     | Actividad enzimática= 5 U/mg |
| Tetraborato de sodio       | $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ | Fisher Scientific Company | 100%                         |
| Ácido bórico               | $\text{H}_3\text{BO}_3$                                      | Riedel-de Haen            | 98%                          |
| Cloruro de potasio         | $\text{KCl}$                                                 | Merck                     | 98%                          |
| Ácido clorhídrico          | $\text{HCl}$                                                 | Sigma-Aldrich             | 37%                          |

|                               |                                                                                   |                                                                        |                                     |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Salicilato de sodio           | $C_7H_5NaO_3$                                                                     | Sigma-Aldrich                                                          | 99,5 %                              |
| di-cloroisocianurato de sodio | $C_3Cl_2N_3NaO_3$                                                                 | Sigma-Aldrich                                                          | 100%                                |
| Nitroprusiato de sodio        | $Na_2[Fe(CN)_5NO].2H_2O$                                                          | Merck                                                                  | 100%                                |
| Quitosano                     |  | Sigma                                                                  | 85%<br>desacetilado                 |
| Nanopartículas de oro         | -----                                                                             | Facultad de Farmacia<br>Laboratorio de Investigaciones Electroquímicas | 40-80 nm                            |
| Nanopartículas de oro         | -----                                                                             | Facultad de Farmacia<br>Laboratorio de Investigaciones Electroquímicas | 40-80 nm<br>Dispersión en quitosano |

### II-3.3. Preparación de soluciones.

**Solución de quitosano:**

Se prepararon soluciones de quitosano a varios pHs para los diferentes métodos de formación de la película.

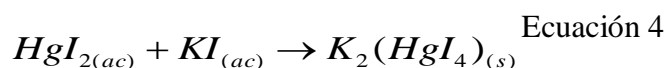
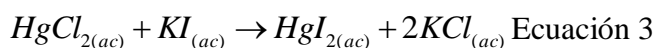
- Solución de quitosano 1% p/v, pH 1,0: para la preparación de esta solución se siguió el método descrito por Maiz <sup>(54)</sup>, para lo cual se pesaron 0,5 g de quitosano, se mezcló con 50 mL de ácido acético al 1% y se agitó a temperatura ambiente por tres horas hasta su completa disolución. Se obtuvo una solución gelatinosa, la cual se almacenó a 4°C en hasta el momento de uso.



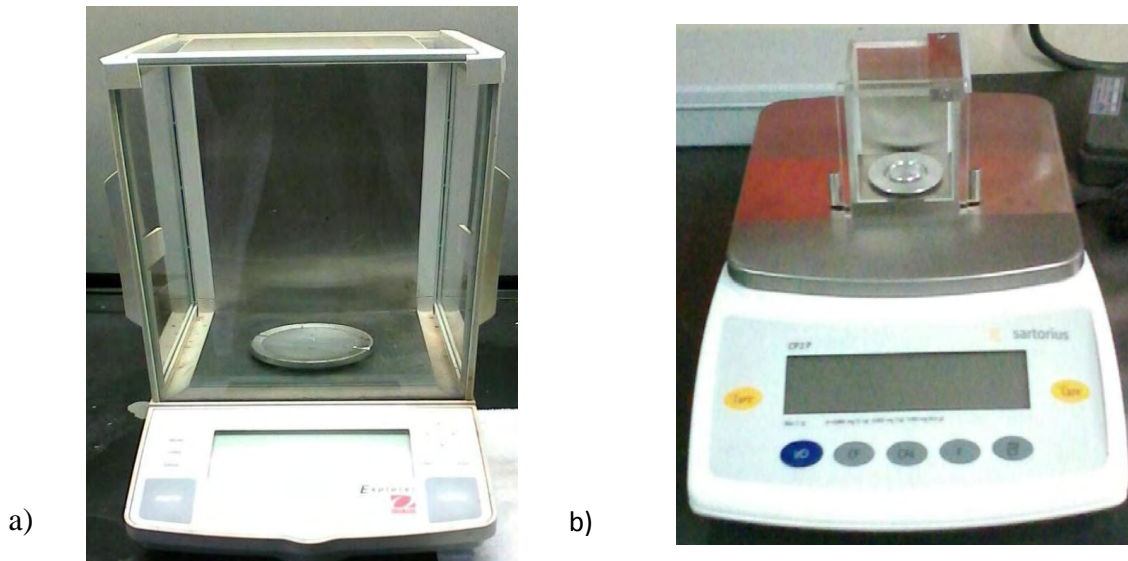
- Solución de quitosano 1% p/v, pH 4,0: se pesaron 0,5 g de quitosano, se mezcló en 50 mL de HCl pH 4 y se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 48 horas. La solución se almacenó a 4 °C hasta el momento de su empleo.

- **Solución de ureasa:** se prepararon soluciones de ureasa a varias concentraciones (2 mg/mL y 4 mg/mL), para la primera se pesaron 10,783 mg y para la segunda 20,265 mg, se disolvieron en 5 mL de buffer fosfato pH 7,2, se agitaron a temperatura ambiente, hasta que el compuesto se disolvió por completo. La solución se almacenó a 4 °C hasta el momento de su uso.
- **Reactivo de Nessler:** se colocaron 5 g de ioduro de potasio en 5 mL de agua desionizada y se agregó lentamente con agitación una solución saturada de cloruro mercúrico hasta la formación de un precipitado color rojo (tetrayodomercurato de potasio  $K_2[HgI_4]$ ) (ecuación 3 y 4), a esta mezcla se le adicionó 40 mL de una solución 0,1 M de hidróxido de potasio, posteriormente se le agregó 0,5 mL adicionales de la solución saturada de cloruro mercúrico, por último se enrazó con agua desionizada en un matraz de 100 mL y se dejó que el precipitado sedimentara durante toda la noche.

Reacción para la síntesis o formación del reactivo de Nessler



Para la preparación de las soluciones se utilizaron dos balanzas con diferentes apreciaciones.

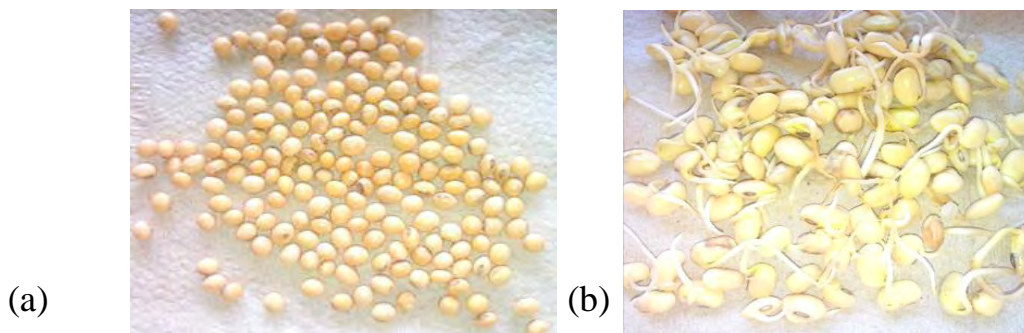


**Figura 13.** a) Balanza marca OHAUS apreciación 0,0001 g. b) balanza marca Sartorius apreciación 0,001 mg.

## II-4. Material biológico y procedimientos experimentales:

### II-4.1 Germinación de las semillas de soya.

Inicialmente se lavaron 50 g de semillas de soya con una solución de hipoclorito de sodio al 5% y posteriormente se enjuagaron con abundante agua, para así evitar que las mismas fueran atacadas por hongos y bacterias que afectarían el proceso de germinación. Posteriormente se germinaron durante 5 días en un recipiente pequeño (frasco de compota). (figura 14).

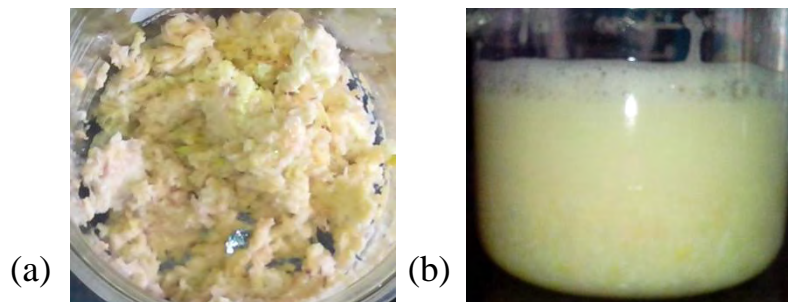


**Figura 14.** a) Semillas de soya. b) Semillas de soya germinadas.

### II-4.2. Extracción de la ureasa.

La extracción de la proteína se realizó siguiendo el procedimiento descrito por EL-Hefnawy y colaboradores<sup>(55)</sup>, en donde utilizan semillas germinadas de soyas para aislar la

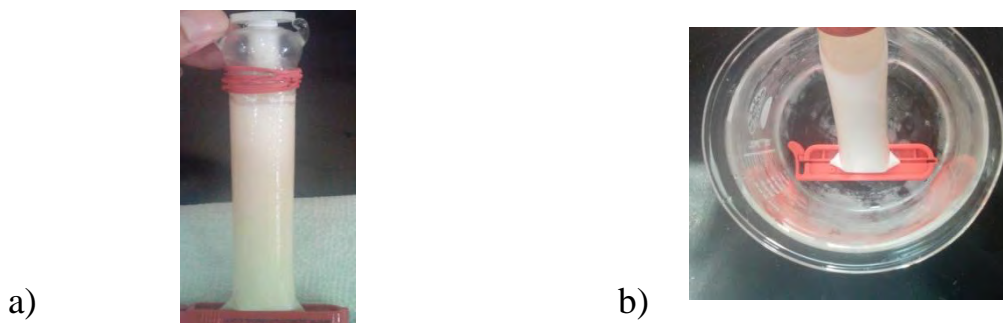
enzima. Para ello se utilizaron 36 g de estas semillas, se trituraron, se suspendieron en 144 mL de una solución de 20% acetona-agua durante 3 horas y agitando ocasionalmente; transcurrido el tiempo se filtró y el sobrenadante se centrifugó durante 15 min. La mezcla se decantó, se le adicionó 150 mL de acetona fría para la formación de un precipitado que posteriormente se centrifugó durante 30 min y el sólido remanente se disolvió en una cantidad mínima de agua (figura 15).



**Figura 15.** a) semillas germinadas de soya trituradas. b) Semillas de soya trituradas en solución de acetona.

#### II-4.3. Purificación del extracto de ureasa.

Para la purificación del extracto se empleó una membrana marca Thomas Scientific con un diámetro de 24 mm y un volumen/longitud de 3,3 mL/cm, el mismo se dializó con agua desionizada por 48 horas hasta no observar cambio en la conductividad (Figura 16).



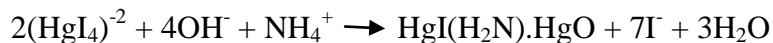
**Figura 16.** (a) Membrana de diálisis con extracto en su interior. (b) membrana de diálisis dentro del agua desionizada.

#### II-5. Determinación de la actividad de la ureasa.

##### II-5.1. Método colorimétrico de Nessler. <sup>(56)</sup>

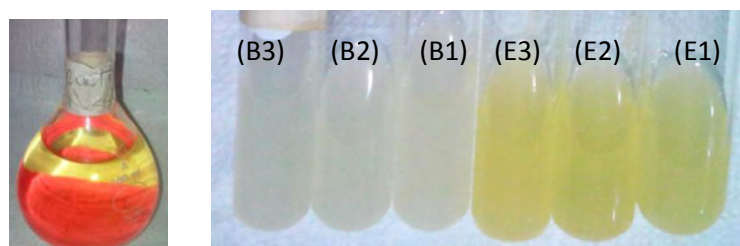
La proteína purificada se cuantificó por un método colorimétrico basado en la reacción de los iones amonio generados en la hidrólisis de la urea con el reactivo de Nessler (ecuación 5), el cual produce una coloración gradual de amarillo a pardo a medida que

aumenta la concentración de amonio, el color amarillo es indicador de bajas concentraciones de iones amonio (menores de 5 mg/mL) y el color pardo rojizo se aprecia cuando la concentración de amonio es superior de 5 mg/mL.



**Ecuación 5.** *Reacción del reactivo de Nessler con el amonio.*

Esta reacción se realizó adicionando 600  $\mu\text{L}$  del extracto, 2 mL de buffer fosfato pH 7,2, 0,8 mL de una solución de urea 0,64% (0,8 mL de agua para los blancos) y se incubó durante 2 horas a 37°C mediante agitación constante, posteriormente se adicionó a cada uno de los tubos 1 mL de reactivo de Nessler y se midió la absorbancia (figura 17).



**Figura 17.** a) *Reactivo de Nessler.* b) *Incubación del extracto de ureasa en las semillas de soya germinadas.*

## II-5.2. Método de Kandeler y Gerber modificado por Kandeler. <sup>(57)</sup>

Para la determinación del extracto de ureasa se adicionaron 40  $\mu\text{L}$  del extracto de ureasa, 1,5 mL de la solución de urea 79,9mM para las muestras (1,5 mL de agua desionizada para los blancos) y se incubó durante 2 horas a 37°C mediante agitación constante. Una vez finalizado el tiempo de incubación se aforaron los matraces de 10 mL con una solución de KCl 1M acidulada con HCl 1M, y se agitó durante 30 min, cumplido el tiempo de agitación, se tomaron 1,25 mL de cada una de las soluciones de muestra y de los tres blancos y se diluyeron con KCl a 25 mL. Posteriormente, para la formación del complejo coloreado, se tomaron 0,5 mL de esta última solución y se le adicionó 2,5 mL de salicilato de sodio, 1 mL de dicloroisocianida de sodio y se aforó con agua desionizada en un matraz de 10 mL. La solución se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora y se midió la absorbancia a 670 nm. Medidas realizadas en un espectrofotómetro UV-Vis (marca PerkinElmer). (figura 18).



**Figura 18.** *Espectrofotómetro Uv-Vis (marca Perkin Elmer).*

### **II-5.3 Curva de calibración sencilla.**

Para la determinación del nitrógeno amoniacal en la ureasa comercial se empleó el método fotométrico descrito anteriormente en un intervalo de concentraciones de 0,6 a 2,7 mg/L, la medición se realizó a partir de un patrón de cloruro de amonio de 1000 mg de  $\text{NH}_4^+$ /L.

### **II-5.4. Curva de calibración estándar.**

Para la determinación de la actividad de la ureasa en el extracto de soya, se tomó un volumen fijo del extracto incubado a 37 °C durante 2 h (sección II.5.2) y se le adicionó a los patrones de la solución de cloruro de amonio, la curva se realizó en un intervalo de concentraciones de 0,6 a 2,7 mg/L. las soluciones patrones se realizaron a partir de una solución madre de cloruro de amonio de 1000 mg/L.

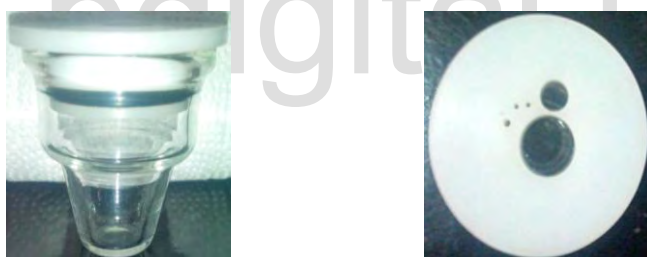
### **II-6. Sistema electroquímico.**

Para los estudios electroquímicos se utilizó un Potenciostato/Galvanostato modelo 273 conectado a un computador Pentium (figura 19) para el procesamiento de los datos registrados.



**Figura 19.** Fotografía del Potenciostato/Galvanostato (modelo 273) acoplado a un computador Pentium.

Para los estudios voltamperométricos y potenciométricos se empleó una celda cónica de vidrio con un solo compartimiento y una capacidad de 3 mL, dispuesta con una tapa que contiene tres orificios para la separación adecuada de los electrodos (figura 20), en esta celda se incorporó una conexión de gas nitrógeno que permiten desplazar el oxígeno atmosférico del seno de la solución.



**Figura 20.** Fotografías de la celda de vidrio.

Como electrodo de trabajo se utilizó un electrodo de carbón vítreo E-100-GC marca ELCHEMA con una geometría de superficie de  $0,11 \text{ cm}^2$ , el cual fue tratado mecánicamente con alúmina de  $0,3 \mu\text{m}$  y  $0,05 \mu\text{m}$  hasta grado espejo, realizando movimiento manuales en forma de ocho, bajo un patrón de 2 series y 80 repeticiones, posteriormente la superficie pulida fue tratada con abundante agua desionizada, para posteriormente secar la superficie con papel óptico. Una vez completado el tratamiento mecánico, el electrodo se sometió a un procedimiento de oxidación electroquímica mediante la aplicación de un pulso de potencial de  $1,5 \text{ V vs Ag/AgCl}$  por  $60 \text{ s}$  sumergido en una solución de  $\text{NaOH } 0,2 \text{ M}$ . Como electrodo de referencia se empleó un electrodo de  $\text{Ag/AgCl}$ . Como contraelectrodo o electrodo auxiliar se utilizó una malla de platino



flameada antes y después de su uso. Los electrodos utilizados para los estudios amperométrico y potenciométricos se pueden observar en la figura 21.



**Figura 21.** *Fotografía de los electrodos empleados en este estudio.*

### **II-6.1. Voltamperometría cíclica.**

Las superficies de carbón vítreo se caracterizaron mediante la técnica de voltamperometría cíclica, empleando la cupla redox hidroquinona/quinona, en el sistema electroquímico descrito anteriormente.

La respuesta voltamétrica del carbón vítreo fue determinada empleando una solución de 5mM de hidroquinona empleando como electrolito soporte KCl 1M y los diferentes buffer mencionados en la discusión de los resultados a velocidades de barrido de 250, 100, 75, 50, 25 y 10 mV/s en una ventana de potencial distinta para cada buffer.

### **II-6.2. Microscopia óptica.**

Los registros fotográficos del electrodo de carbón vítreo sin modificar y modificado con las diferentes películas se realizaron en un microscopio óptico Nikon modelo DIAPHOT300 (figura 22).



**Figura 22.** *Fotografía del Microscopio óptico Nikon/ DIAPHOT300.*

### **II-6.3. Potenciometría.**

Para las medidas potenciométricas se utilizó un multímetro de alta impedancia modelo (Fluke) (figura 23).



**Figura 23.** *Multímetro (Fluke).*

### **II-7. Modificación de la superficie del electrodo de trabajo con quitosano.**

El electrodo de carbón vítreo se modificó con diferentes soluciones de quitosano. Inicialmente se ensayó la electrodeposición con el quitosano disuelto en ácido acético pH 1 (sol. de quitosano detallado en la sección II-3.3) a varios potenciales catódicos -1,15; -1,2; -1,4 V vs Ag/AgCl y diferentes tiempos de duración del pulso (30, 60 y 120 min),



encontrándose los mejores resultados a  $-1,15$  V vs Ag/AgCl por 120 min. Debido a los problemas presentados durante la realización de los experimentos con la enzima ureasa (II.8), se optó por preparar una solución de quitosano con un pH menos ácido, (sol. Quitosano en HCl pH 4, detallada en la sección experimental II-3.3). Posteriormente se evaluó la modificación del electrodo por electrodeposición con esta solución de quitosano pH 4 a varios potenciales negativos  $-1,15$  V;  $-1,2$  V;  $-1,3$  V;  $-1,6$  V vs Ag/AgCl por un tiempo de 120 min. Encontrándose que el potencial óptimo fue de  $-1,3$  V vs Ag/AgCl.

### **II-7.1. Inmovilización de la enzima ureasa comercial sobre el electrodo de carbón vítreo modificado con quitosano para las medidas amperométricas.**

Sobre el electrodo de carbón vítreo cuya superficie fue modificada con una película de quitosano pH 1, se realizó la inmovilización de la enzima ureasa siguiendo el método descrito por Maiz<sup>(54)</sup>, para lo cual se colocaron alícuotas de (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90)  $\mu$ L de la enzima ureasa (solución 2 mg/mL) y se dejó en reposo hasta disipar el exceso de humedad a temperatura ambiente por un tiempo aproximado de 20 min, previo a su uso la superficie se lava con un buffer fosfato pH 7,2.

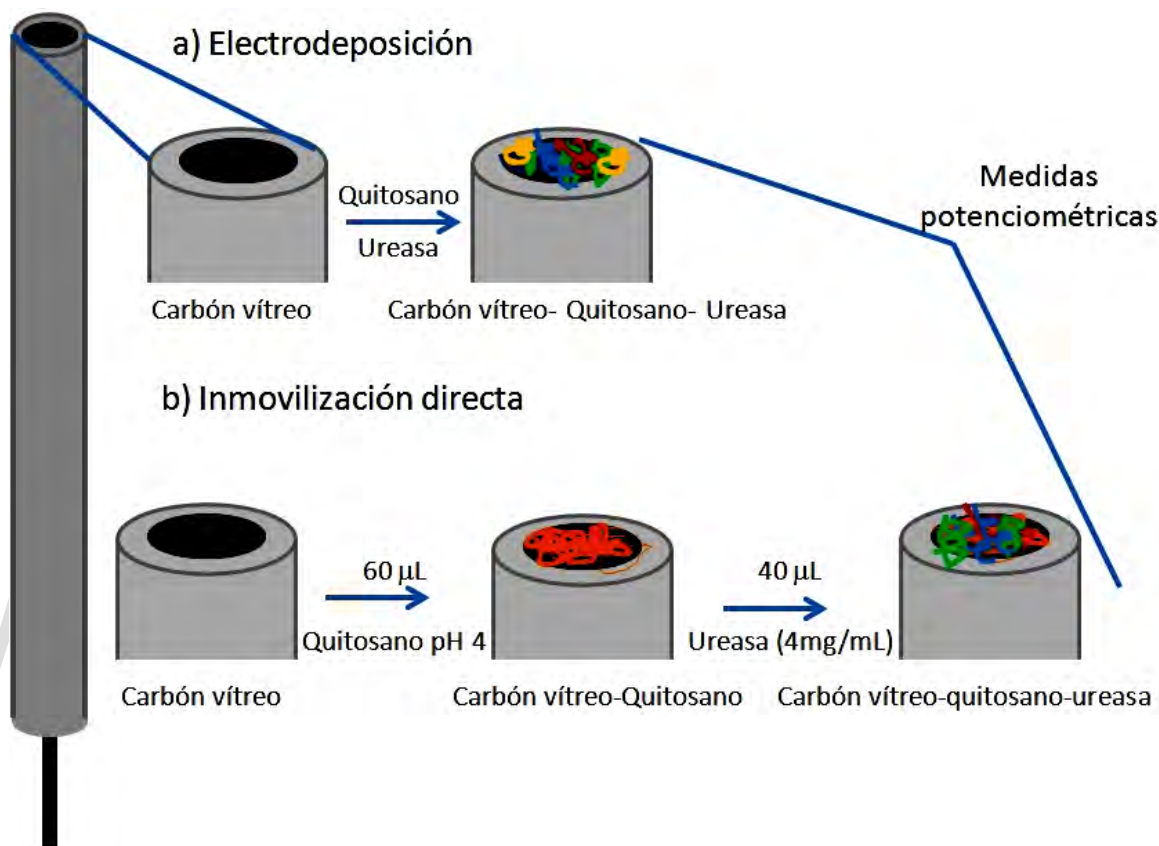
### **II-7.2. Estudio electroquímico de la urea en superficies de carbón vítreo modificado con quitosano- ureasa.**

Se estudió la respuesta electroquímica de la urea utilizando un electrodo de carbón vítreo modificado con una película de quitosano e inmovilizando la enzima ureasa mediante el método descrito en la sección II.7.1, para esto se preparó una solución de urea 50 mM y 500 mM en buffer fosfato pH 7,2, ambas soluciones por separado se desgasificaron con nitrógeno por cinco minutos antes de realizar el experimento, el mismo se realizó utilizando la técnica de voltamperometría cíclica a diferentes velocidades de barridos de 10, 25, 50, 100, 250 mV/s y a temperatura ambiente.

### **II-8. Modificación del electrodo de carbón vítreo con la enzima ureasa comercial y quitosano para las medidas potenciométricas.**

Por los inconvenientes presentados con el método de inmovilización descrito en la sección II.7.1, se planteó otra forma de modificar el electrodo de carbón vítreo. Método a) Por electrodeposición con una solución de quitosano y ureasa (3,5 mL de quitosano pH 4 + 0,5 mL de solución Ureasa comercial 4 mg/mL), se dejó secar hasta disipar el exceso de

humedad y posteriormente se realizaron las medidas potenciométricas. Método b) Por inmovilización directa, para ello se realizó la modificación capa por capa, se colocaron 60  $\mu\text{L}$  de la solución de quitosano pH 4, se dejó secar y se le colocó 40  $\mu\text{L}$  de la solución de ureasa comercial a mayor concentración (solución 4mg/mL) (figura 24).



**Figura 24.** Esquema del procedimiento descrito en la sección II.8.

### II-8.1. Estudio potenciométricos de la urea en superficies de carbón vítreo modificado con quitosano- ureasa.

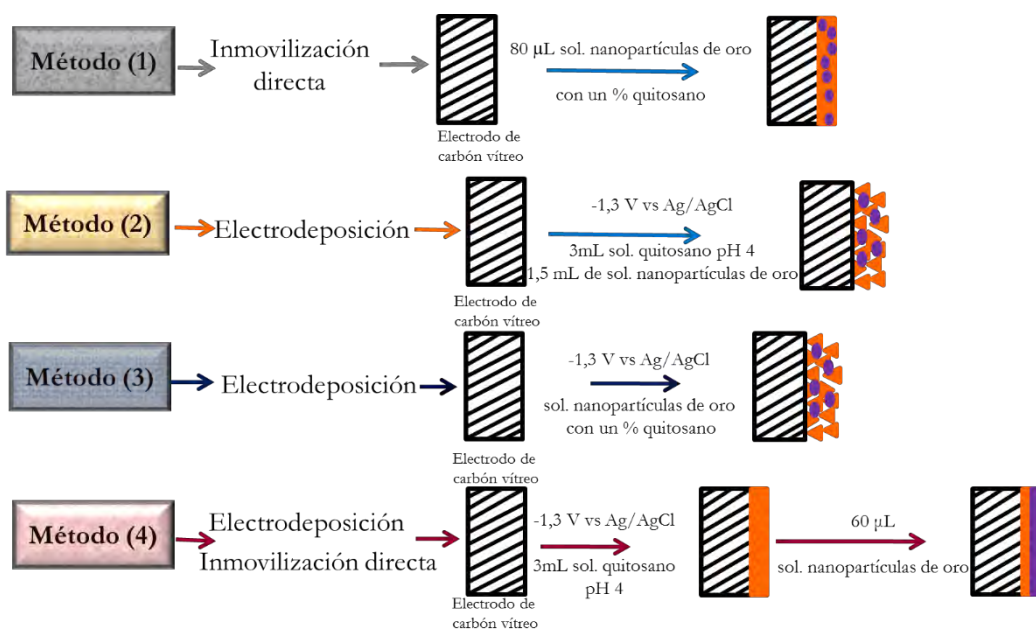
Se evaluaron las respuestas potenciométricas de soluciones de urea a dos concentraciones distintas (50mM y 500 mM), utilizando el electrodo de carbón vítreo modificado con una película de quitosano e inmovilizando la enzima ureasa comercial de las diferentes formas descritas en la sección II.8. El experimento consistió en medir la diferencia de potencial generada entre el electrodo indicador y el electrodo de referencia, que se encuentran sumergidos en 4 mL de buffer fosfato pH 7,2, a esta solución se le fue adicionando alícuotas de 0,02 mL de solución de urea cada 10 min durante dos horas, transcurrido este tiempo, se modificó el volumen de las alícuotas a 0,24 mL, adicionándolas

igualmente cada 10 min durante una hora. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente por tres horas y por triplicado.

## **II-9. Modificación de la superficie del electrodo de trabajo con quitosano y nanopartículas de oro.**

El electrodo de carbón vítreo se modificó con la solución de quitosano pH 4 y una solución de nanopartículas de oro, mediante la realización de diferentes métodos (figura 25):

1. Por inmovilización directa al electrodo de trabajo de 80  $\mu\text{L}$  de la solución de nanopartículas de oro con un porcentaje de quitosano.
2. Por electrodeposición de quitosano con las nanopartículas de oro con una solución que contenía 3 mL de la solución de quitosano pH 4 y 1,5 mL de la solución de nanopartículas de oro pH 6,58, aplicándole un pulso de potencial de -1,3 V vs Ag/AgCl durante 2 h.
3. Por electrodeposición con una solución de nanopartículas de oro preparada con quitosano. El método consistió en aplicarle un pulso de potencial al electrodo de trabajo de -1,3 V vs Ag/AgCl durante 2 h.
4. Por electrodeposición de quitosano pH 4, aplicándole un pulso de potencial del electrodo de -1,3 V vs Ag/AgCl y seguidamente se inmovilizó directamente con 60 $\mu\text{L}$  de la solución de nanopartículas de oro, y se dejó secar hasta disipar todo exceso de humedad.

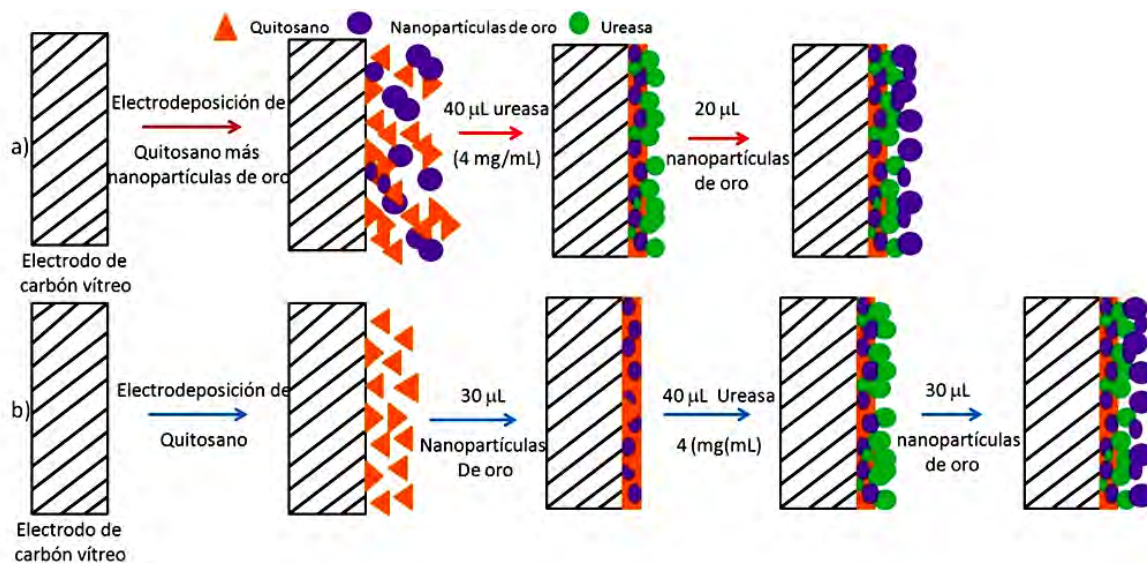


**Figura 25.** Esquema del procedimiento descrito en la sección II.9.

### II-9.1. Modificación de la superficie del electrodo de trabajo con quitosano, nanopartículas de oro y ureasa comercial.

La ureasa comercial se inmovilizó en la superficie electródica de carbón vítreo, modificado con los métodos descritos en la sección II-9:

- Se siguió el método descrito en la sección II-9 (2) para la modificación del electrodo, una vez electrodepositado el quitosano junto con las nanopartículas de oro, se dejó secar hasta disipar todo exceso de humedad y le colocaron 40 µL de la solución de ureasa 4mg/mL, posteriormente se le colocaron 20 µL de la solución de nanopartículas de oro.
- Se siguió el método descrito en la sección II-9 (4) para la modificación del electrodo. Una vez electrodepositado el quitosano pH 4, se dejó secar la película y se le colocaron 30 µL de la solución de nanopartículas de oro, 40 µL de de la solución de ureasa 4mg/mL y por último se le colocaron 30 µL de nanopartículas de oro (figura 26).



**Figura 26.** Esquema del procedimiento descrito en la sección II-9.1.

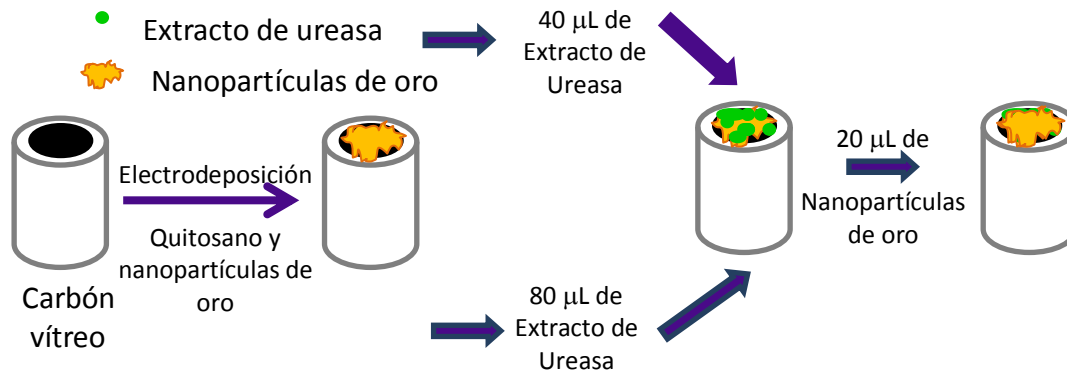
### II-9.2. Estudios potenciométricos de la urea en superficies de carbón vítreo modificado con quitosano, nanopartículas de oro y ureasa comercial, para las medidas potenciométricas de urea.

Se evaluó la respuesta potenciométrica de la urea a una concentración de 500 mM, utilizando un electrodo de carbón vítreo modificado con los métodos descritos en la sección II-9.1, el experimento consistió en medir la diferencia de potencial generada en el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia, que se encuentran sumergidos en 4 mL de una solución buffer fosfato pH 7,2, a esta solución se le fue adicionando alícuotas de 0,02 mL de solución de urea 500 mM cada 10 min durante dos horas, transcurrido este tiempo, se incrementó el intervalo de concentración de urea, modificando el volumen de las alícuotas a 0,24 mL, adicionándolas igualmente cada 10 min durante una hora. Los experimentos se realizaron por tres horas, a temperatura ambiente.

### II-10. Modificación de la superficie del electrodo de trabajo con quitosano, nanopartículas de oro y extracto de ureasa para las medidas potenciométricas.

El extracto de ureasa se inmovilizó en la superficie electródica de carbón vítreo, modificado con el método descrito en la sección II-9 (2), una vez electrodepositado el quitosano pH 4 junto con las nanopartículas de oro, se dejó secar la película y se le colocó:

- a) 40  $\mu\text{L}$  de la solución de extracto de ureasa y por último se le colocó 20  $\mu\text{L}$  de solución de nanopartículas de oro.
- b) 80  $\mu\text{L}$  de la solución de extracto de ureasa y por último se le colocó 20  $\mu\text{L}$  de solución de nanopartículas de oro. (figura 27).



**Figura 27.** Esquema del procedimiento experimental detallado en la sección II.10.

### II-10.1. Estudios potenciométricos de la urea en superficies de carbón vítreo modificado con quitosano- nanopartículas de oro- extracto de ureasa.

Se evaluó la respuesta potenciométrica de la urea a una concentración de 500 mM, utilizando un electrodo de carbón vítreo modificado con los métodos descritos en la sección II-10, el experimento consistió en medir la diferencia de potencial generada en el electrodo de indicador y el electrodo de referencia, que se encuentran sumergidos en 4 mL de una solución buffer fosfato pH 7,2, a esta solución se le fue adicionando alícuotas de 0,02 mL de solución de urea 500 mM cada 10 min durante dos horas, transcurrido este tiempo, se incrementó el intervalo de concentración de urea, modificando el volumen de las alícuotas a 0,24 mL, adicionándolas igualmente cada 10 min durante una hora. Los experimentos se realizaron por dos horas, a temperatura ambiente.

# Capítulo III

## Resultados y discusión:

### W Caracterización del elemento e de reconocimiento

### **III-1. Enzima.**

#### **III-1.1. Determinación de la actividad de la ureasa.**

Inicialmente se caracterizó el sistema de reconocimiento, que en este caso es la enzima ureasa obtenida comercialmente y la extraída de las semillas de soya germinadas, para verificar su actividad y asegurarse que las mismas eran idóneas para la inmovilización en un soporte o directamente sobre la superficie electródica. Esta caracterización se realizó mediante los métodos detallados en la sección II-5. Inicialmente se empleó el método colorimétrico de Nessler (sección II-5.1), en donde el yodomercuriato potásico en solución alcalina forma, con el amonio proveniente de la reacción con la enzima, un complejo de color amarillo-pardo rojizo cuya densidad óptica a 440 nm debe permitir cuantificar la actividad enzimática mediante una curva patrón. Sin embargo, con este método sólo se pudo determinar cualitativamente la presencia del amonio debido a que a pesar que se formó el complejo de color amarillo esperado, indicando así la presencia de iones amonio, al medir la absorbancia en el espectro Uv-Vis no se observó ningún banda claramente definida característica del complejo, por lo que no se logró cuantificar la actividad de la ureasa por este método. Para solventar esta situación se empleó el método descrito por Kandeler y Gerber modificado por Kandeler<sup>(57)</sup> detallado en la sección II-5.2, el cual se basa en la formación de un complejo color verde azulado mediante la reacción de los iones amonio, liberados en la hidrólisis de la urea, con el salicilato de sodio en presencia del dicloroisocianida de sodio y el catalizador nitroprusiato de sodio; bajo estas condiciones la intensidad del color obtenido es proporcional a la concentración del amonio cuya absorbancia se mide a 610 nm<sup>(57)</sup>.

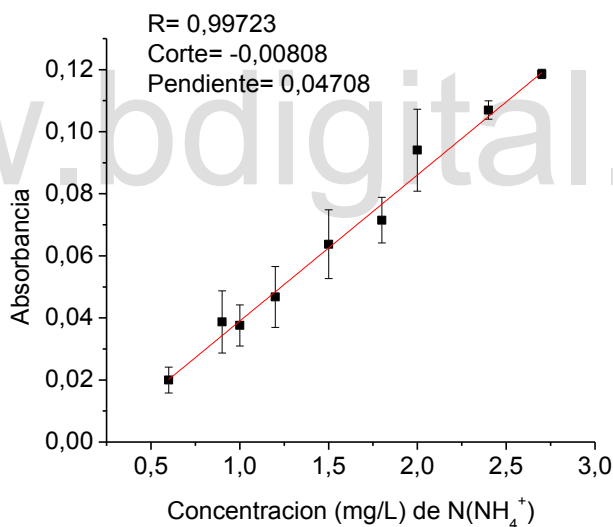
Para la determinación de la actividad de la ureasa comercial se realizó una curva de calibración sencilla, puesto que ni los componentes de la matriz de la muestra ni los reactivos empleados afectan las medidas de la señal analítica. Con los datos mostrados en la tabla 2 se elaboró la figura 28, la cual muestra la curva de calibración sencilla del nitrógeno amoniacal obtenida para la determinación de la actividad de la ureasa comercial. De esta figura se aprecia una respuesta lineal en un intervalo de concentración de 0,6 a 2,7 mg/L de  $N(NH_4^+)$  lo cual es indicativo de que la respuesta instrumental es directamente proporcional a la concentración del analito. Con los valores de la pendiente y del punto de corte



obtenidos por medio de la curva de calibración sencilla se determinó el valor de la actividad enzimática, la cual arrojó un resultado de 1,86 U/mL (ver anexo I-2.).

Tabla 2. Medidas de absorbancia en función de la concentración de nitrógeno amoniacal obtenidas a 670 nm adaptado de la referencia <sup>(57)</sup>.

| Concentración<br>mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L (ppm) | Absorbancia |        |        |
|-------------------------------------------------------------|-------------|--------|--------|
| 0,6                                                         | 0,0151      | 0,0219 | 0,0228 |
| 0,9                                                         | 0,0271      | 0,0445 | 0,0444 |
| 1,0                                                         | 0,0302      | 0,0431 | 0,0393 |
| 1,2                                                         | 0,0357      | 0,0543 | 0,0503 |
| 1,5                                                         | 0,0510      | 0,0707 | 0,0696 |
| 1,8                                                         | 0,0632      | 0,0772 | 0,0740 |
| 2,0                                                         | 0,0789      | 0,1031 | 0,1002 |
| 2,4                                                         | 0,1038      | 0,1096 | 0,1075 |
| 2,7                                                         | 0,1190      | 0,1199 | 0,1170 |



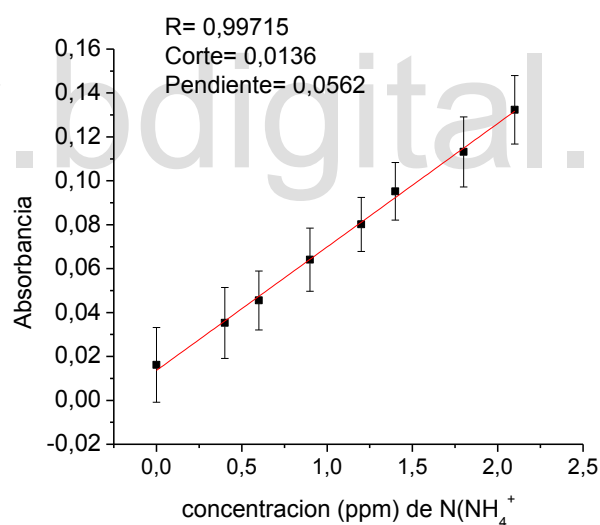
**Figura 28.** Curva de calibración sencilla de la medida de nitrógeno amoniacal.

Para determinar la actividad de la ureasa en el extracto de soya fue necesario considerar el efecto de matriz debido a que en el extracto se encuentran presentes diferentes proteínas y sales que pudiesen aumentar o disminuir la magnitud de la señal analítica, lo que generaría un cálculo inexacto de la actividad enzimática. Con el objetivo de minimizar los efectos de matriz se utilizó el método de adición estándar, de esta manera todas las señales son afectadas de forma similar por los interferentes. En la tabla 3 se muestran los valores de absorbancia para cada una de los estándares medidos a una longitud de onda de

659,28 nm los cuales fueron utilizados para construir la curva de calibración de absorbancia vs concentración de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (figura 29), la cual se utiliza para determinar la actividad enzimática generando un valor de 14,41 U/mL. (ver anexo I-2)

Tabla 3. Medidas de absorbancia en función de la concentración de nitrógeno amoniacal obtenidas a 659,28 nm adaptado de la referencia <sup>(57)</sup>.

| Concentración<br>mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L (ppm) | Absorbancia |        |        |
|-------------------------------------------------------------|-------------|--------|--------|
| 0                                                           | 0,0100      | 0,0030 | 0,0354 |
| 0,4                                                         | 0,0280      | 0,0240 | 0,0538 |
| 0,6                                                         | 0,0397      | 0,0360 | 0,0609 |
| 0,9                                                         | 0,0547      | 0,0569 | 0,0806 |
| 1,2                                                         | 0,0738      | 0,0723 | 0,0944 |
| 1,4                                                         | 0,0955      | 0,0819 | 0,1082 |
| 1,8                                                         | 0,1111      | 0,0984 | 0,1301 |
| 2,1                                                         | 0,1259      | 0,1210 | 0,1501 |



**Figura 29.** Curva de calibración estándar de la medida de nitrógeno amoniacal.

Los resultados obtenidos para ambas muestras indican que las ureasas están activas, aunque el valor obtenido para la ureasa comercial, es menor del reportado por el proveedor (5U/mL), lo cual pudiese deberse a que no se disponía (por el fabricante y/o proveedor nacional) de la fecha de entrada al país o del seguimiento de la cadena de frío a la cual fue sometida la muestra de ureasa. Lamentablemente los intentos por lograr obtener muestras de ureasa pura por parte de la casa comercial Merck o sus representantes nacionales, fueron infructuosas, por otra parte, los intentos por adquirir esta enzima en Colombia fueron

paralizados al no poder tener acceso a divisas en dólares o euros por las fuentes oficiales venezolanas.

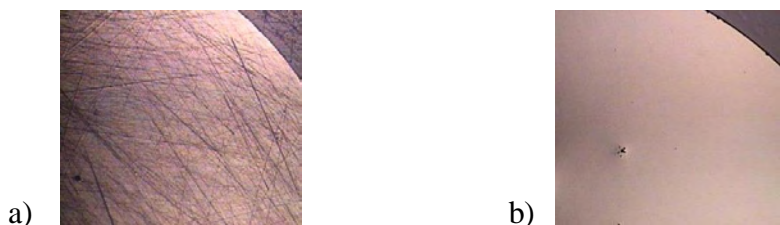
## III-2 Caracterización del transductor

### III-2.1 Transductor.

El transductor (superficie electródica) es responsable de convertir los cambios que ocurren en el elemento de reconocimiento cuando interactúa con su sustrato, ya sean variaciones de las propiedades físicas o químicas, en una señal que puede ser amplificada, almacenada y registrada<sup>(58)</sup>. En este trabajo se empleó un electrodo de carbón vítreo como transductor electroquímico para la realización de un biosensor amperométrico y potenciométrico, el cual debió caracterizarse previo a la inmovilización del elemento de reconocimiento (ureasa) o del soporte (quitosano), debido a que la respuesta de este transductor se ve afectada por el estado en que se encuentra la superficie, ya que las modificaciones afectarán las respuestas electroquímicas.

### III-2.2. Caracterización de la superficie de carbón vítreo (transductor).

El éxito en el estudio electroquímico de una sustancia electroactiva radica en utilizar una superficie electródica adecuada exenta de impurezas, para esto es necesario seguir protocolos de limpieza que permitan obtener superficies homogéneas y limpias que garanticen resultados reproducibles. Dada esta situación, se procedió a realizar un pulido mecánico de la superficie electródica con alúminas de diferente diámetro (sección experimental II-6), este tratamiento se realiza con el objetivo de intentar eliminar las posibles impurezas, surcos, imperfecciones o marcas que presente la superficie electródica.



**Figura 30.** a) Superficie del electrodo de carbón vítreo antes del tratamiento mecánico y químico  
b) superficie del electrodo de carbón vítreo después del tratamiento mecánico y químico.

La figura 30 muestra las imágenes obtenidas por microscopía óptica de la superficie de carbón vítreo previo y posterior al tratamiento mecánico. De esta figura se puede observar (Figura 30a) que el electrodo originalmente presentaba una superficie rugosa, con

muchas imperfecciones y poco uniforme, mientras que posterior al proceso de pulitura grado espejo (figura 30b) se aprecia que dicho tratamiento de limpieza fue efectivo debido a que genera superficies lisas y homogéneas.

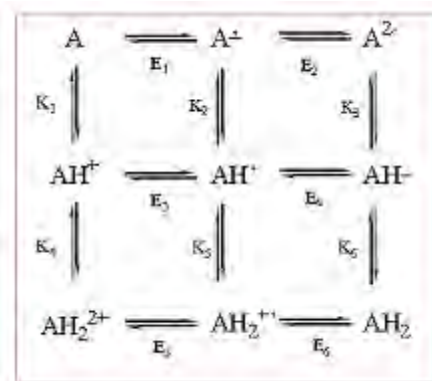
Posterior a la limpieza mecánica se realizó una modificación química a dicha superficie, la cual se logró realizar al aplicar un pulso de potencial anódico en un medio básico, este proceso indujo la oxidación de grupos funcionales del tipo alcohólico y carbonílico presentes en esta superficie electródica, generando grupos funcionales más oxidados los cuales tienden a mejorar la interacción o absorción de compuestos orgánicos sobre su superficie<sup>[ (59)- (60)]</sup>. Ambos tratamientos se describen detalladamente en la sección II-6.

### **III-2.2. Estudio electroquímico de la cupla redox hidroquinona/quinona sobre carbón vítreo (transductor).**

La voltamperometría cíclica es una técnica que permite caracterizar la superficie de carbón vítreo mediante dos vías: la primera al evaluar la respuesta de esta superficie en un medio electrolítico conductor, de esta manera la presencia de grupos hidroquinónicos provenientes del proceso de activación, sufrirán un proceso redox generando una respuesta característica de baja intensidad<sup>[ (59)- (61)]</sup>.; la segunda, mediante el uso de una especie electroactiva externa, la cual sufrirá una reacción de transferencia electrónica simple y rápida, tal y como la cupla ferrocianuro/ferrocianuro de potasio o hidroquinona/quinona. Esta técnica permite obtener información acerca del proceso redox, mecanismos de reacción, propiedades electrocatalíticas, entre otros procesos que pudieran ocurrir en la interfaz electrodo-solución. En este trabajo se empleó como sistema de caracterización, una solución de hidroquinona en diferentes soluciones amortiguadoras y en un amplio rango de pH.

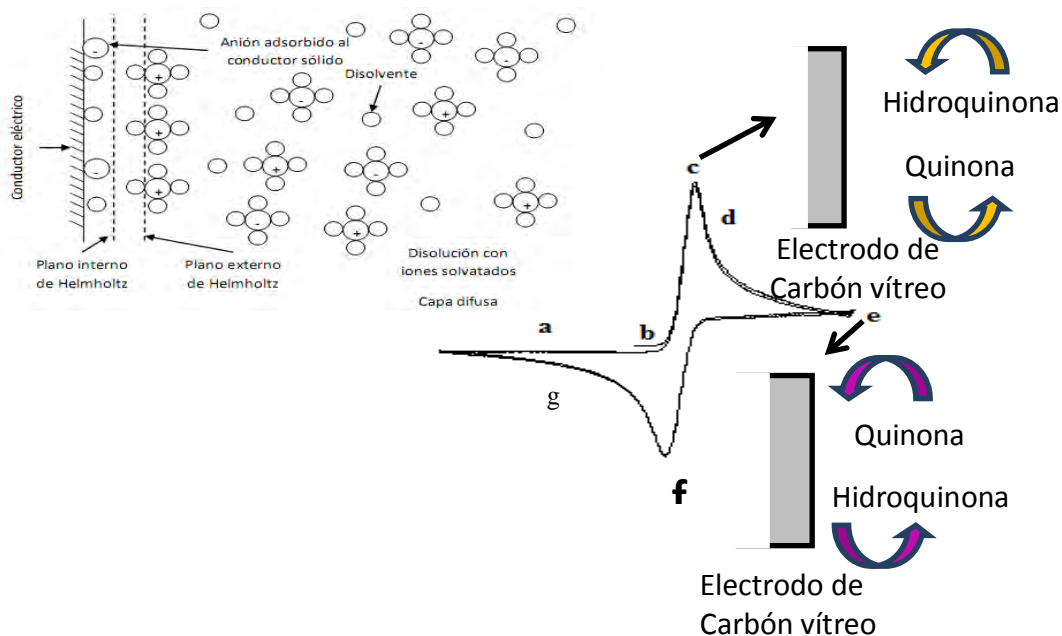
La reducción electroquímica de la hidroquinona fue estudiada por primera vez por Haber y Russ, y se publicó un estudio definitivo realizado por Vetter, el cual concluyó que este compuesto sigue un mecanismo complejo de transferencia de dos electrones y dos protones los cuales son dependientes del pH<sup>(62)</sup> del medio en que se encuentre (figura 31). Así, cuando esta sustancia se encuentra a pH ácido, mostrará una respuesta voltamétrica reversible, caracterizada por diferencia de potenciales de pico del orden de 60 mV y

cocientes de corrientes de pico anódico y catódico de una unidad. Desplazamientos de estos valores son indicativos de perturbaciones en los procesos y velocidades de la transferencia electrónica del sistema, atribuibles a cambios en la estructura de la interfaz electrodo/solución, modificaciones superficiales (activación/deposición/absorción de moléculas sobre la superficie) o cambios drásticos superficiales (bloqueo de la superficie), de allí que la respuesta voltamperométrica cíclica que se obtenga de la evaluación del transductor en un medio que contenga la hidroquinona servirá para evaluar los procesos de modificación superficial y el estado de pureza/actividad de la superficie del transductor.



**Figura 31.** Diagrama de especies intermediarias en el proceso redox de hidroquinona <sup>(54)</sup>

En este trabajo experimental el estudio voltamperométrico se realizó a diferentes ventanas de potencial y en soluciones amortiguadoras con variada acidez, ya que en términos generales, a medida que la solución se hace más básica o se dificulta la transferencia electrónica, las respuestas tanto en potencial como en corriente (anódico y catódico) se desplazan, de allí que, en términos generales, las respuestas voltamperométrica reflejan los procesos de oxidación y reducción de la reacción redox reversible.



**Figura 32.** Esquema de una respuesta electroquímica reversible.

En la figura 32 se muestra cada uno de los pasos que ocurren en la interfaz electrodo-solución durante la realización de un experimento voltamperométrico. Al analizar esta respuesta voltamperométrica característica de una respuesta reversible, se observa inicialmente en la parte “a” de la figura 32, una corriente muy baja la cual es atribuida al rearrreglo de cargas eléctricas, proveniente de la solución electrolítica, en la doble capa eléctrica que se forma en la interfaz electrodo-solución una vez que el electrodo se pone en contacto con la solución, induciendo la generación de corrientes capacitivas, corrientes éstas que se mantienen hasta que se logra alcanzar potenciales correspondientes al potencial umbral (parte b) o de despegue, el cual corresponde a la energía necesaria para que comience la reacción de oxidación, por lo que inmediatamente, y como resultado de este potencial, se aprecia un aumento en la corriente. Al ir incrementando este potencial, se aprecia un aumento exponencial de la corriente hasta alcanzar un valor máximo (parte c), dado que, por ejemplo, la hidroquinona es consumida totalmente en la superficie del electrodo, generando la correspondiente especie oxidada, quinona. Posteriormente se aprecia de la traza voltamperométrica que la corriente de oxidación tiende a disminuir a medida que se continúa aumentando el potencial (parte d), hasta alcanzar una corriente de estado estacionario debido a que las especies empiezan a difundir desde el seno de la solución a la superficie electródica. Una vez alcanzado el valor de potencial de corte

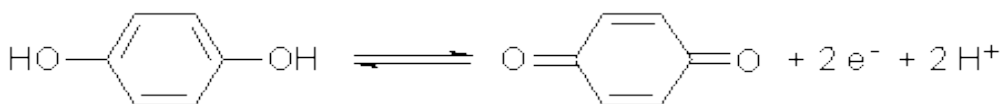
anódico, el barrido de potencial es invertido (parte e) y se obtiene un aumento de corriente catódica correspondiente a la reacción de reducción de la quinona a hidroquinona, hasta que llega a un máximo de conversión de la especie (parte f), y a partir de este máximo de conversión la corriente catódica empieza a disminuir hasta alcanzar nuevamente una corriente de estado estacionario (parte g).

Este tipo de respuesta en electroquímica permite establecer si el proceso redox, descrito anteriormente, se comporta de una manera reversible, cuasi-reversible e irreversible, lo cual se relaciona a la facilidad para que ocurra el proceso redox de la especie estudiada, e implica evaluar estas respuestas a diferentes velocidades de barrido, de allí que se hace necesario considerar y evaluar los criterios de reversibilidad mostrados en la tabla 4.

Tabla 4. Criterios de reversibilidad. <sup>(54)</sup>

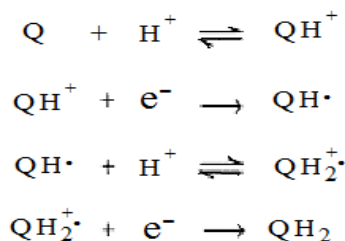
| Reversible                                       | Irreversible                                                                 | Cuasireversible                                                    |
|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| $I_p = 2,69 \times 10^5 AD^{1/2} C v^{1/2}$      | $I_p = 2,69 \times 10^5 n (\alpha_c n_a)^{1/2} C v^{1/2}$                    | $I_p = 2,69 \times 10^5 AD^{1/2} C v^{1/2}$                        |
| $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 59/n \text{ mV}$ | Sólo un $E_p$                                                                | $\Delta E_p > 59/n \text{ mV}$                                     |
| $I E_p - E_{p/2} I = 59/n \text{ mV}$            | $I E_p - E_{p/2} I = 48/\alpha_c n_a \text{ mV}$                             | $I E_p - E_{p/2} I = \text{aumenta con la } v$                     |
| $I I_{pa}/I_{pc} I = 1$                          | -----                                                                        | $I I_{pa}/I_{pc} I = 1$ si $\alpha_c = \alpha_a = 0,5$             |
| $I_p \propto v^{1/2}$                            | $I_{pc} \propto v^{1/2}$                                                     | $I_p$ no son proporcional a $v^{1/2}$                              |
| $E_{pa}, E_{pc}$ son independientes de la $v$    | $E_{pc}$ se desplaza $-30/\alpha_c n_a \text{ mV}$<br>Por cada década de $v$ | $E_{pc}$ se desplaza a valores más negativos cuando la $v$ aumenta |

En la figura 33 se muestran los diferentes voltagramas para la cupla redox hidroquinona/quinona, utilizando el electrodo de carbón vítreo sin modificación a partir de una solución de hidroquinona 5 mM disuelta en diferentes soluciones buffer (ver anexo I-1), en la figura 33 (a) se muestra la respuesta electroquímica 5 mM disuelta en HCl/KCl pH 1, en el voltagrama se pueden observar dos picos bastante definidos característicos de una transferencia electrónica simple reversible, este sistema redox corresponde a la transferencia de dos electrones y dos protones (ecuación 6) y por ende se debería obtener un  $\Delta E_p$  de 59 mV, del análisis de la tabla 4 se observa que el mínimo valor del  $\Delta E_p$  obtenido de este proceso experimental es de 52 mV para la velocidad de barrido de 10 mV/s, cumpliendo así con uno de los criterios de un sistema reversible.



Ecuación 6

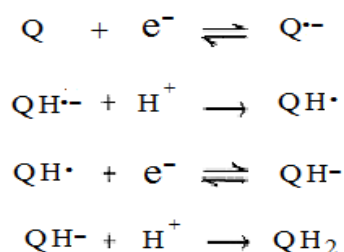
Por otro lado, y como era de esperarse, se aprecia que las respuestas voltamétricas varían en su forma y potencial a medida que cambia el pH de la solución lo cual puede ser atribuido a que estos sistemas quinónicos presentan un comportamiento pH dependiente. Vetter <sup>(62)</sup> planteó que este sistema puede seguir dos mecanismos de transferencia electrónica diferentes, por ejemplo a pH inferiores a 5 el mecanismo propuesto corresponde a un proceso electroquímico-químico (eHeH), el cual implica inicialmente un proceso de transferencia electrónica y luego un proceso controlado por la transferencia de iones hidronio, mientras que en el intervalo de pH 5-6, este mecanismo cambia químico-electroquímico (HeHe).



Ecuación 7

Es por esta razón que el voltagrama de la figura 33 c), a un pH de 5,8 se observan además de los dos picos, un pequeño hombro atribuido al cambio en el mecanismo.

A pH mayor de 6 se propone el siguiente mecanismo

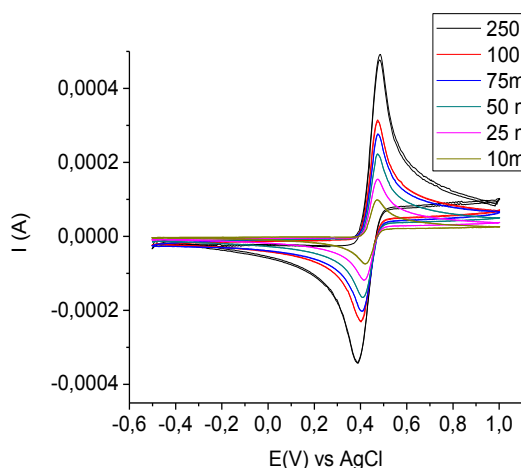


Ecuación 8

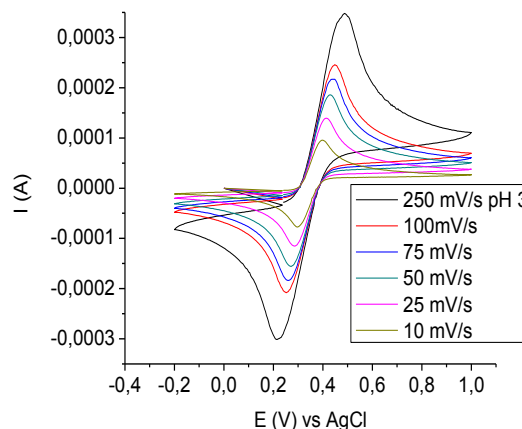
En donde se genera la adición del electrón y protón, en el orden protón, electrón, protón, electrón y se describe como un mecanismo HeHe <sup>(62)</sup> Sin embargo al observar el



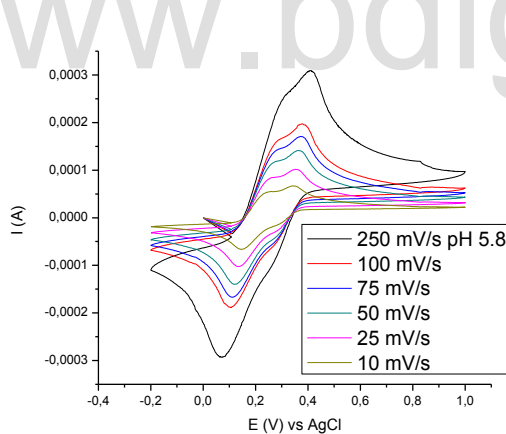
voltamperograma de la figura 33 e) a un pH de 7,2, muestra un comportamiento propio de una transferencia electrónica simple como ocurre en las soluciones ácidas. Y los voltagramas a pH mayores de 7,2 se observa un desplazamiento en el pico anódico y catódico por lo que el  $\Delta E_p$  es mayor, apreciándose también que los picos son anchos y menos definidos.



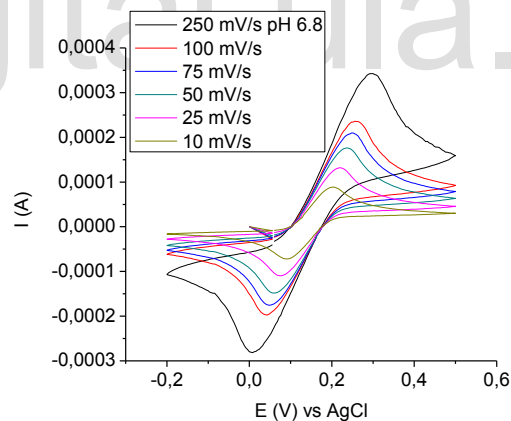
(a) Electrolito soporte KCl/HCl, pH 1



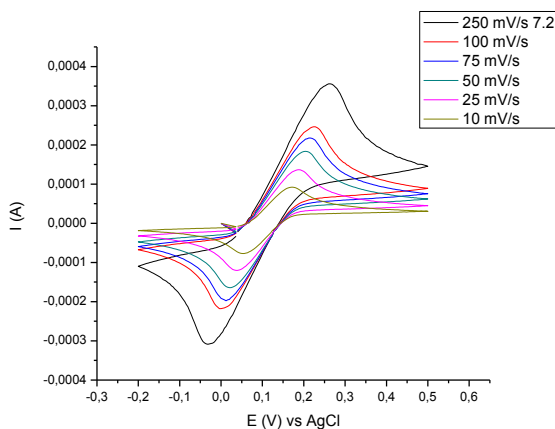
(b) Electrolito soporte KHP/HCl, pH 3



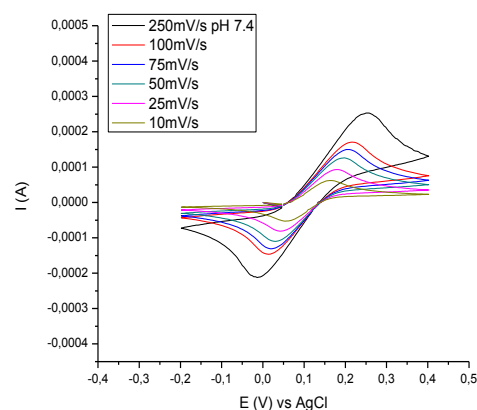
(c) Electrolito soporte  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ , pH 5,8



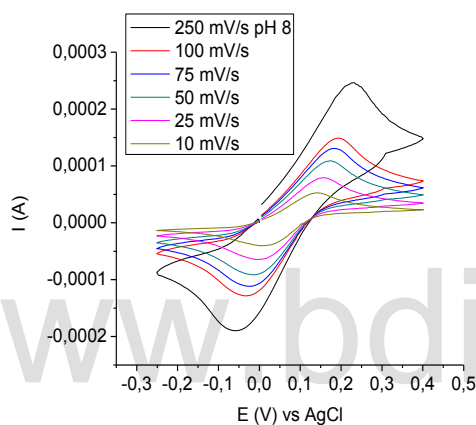
(d) Electrolito soporte  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ , pH 6,8



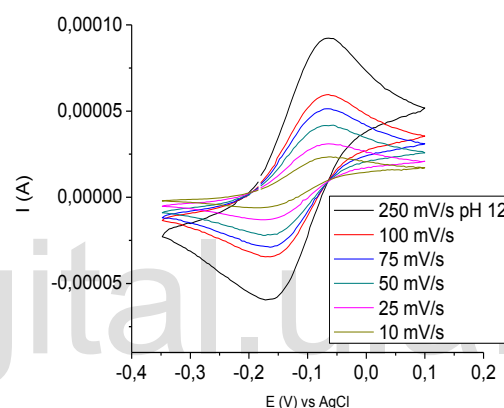
(e) Electrolyte support  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ , pH 7,2



(f) Electrolyte support  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ , pH 7,4



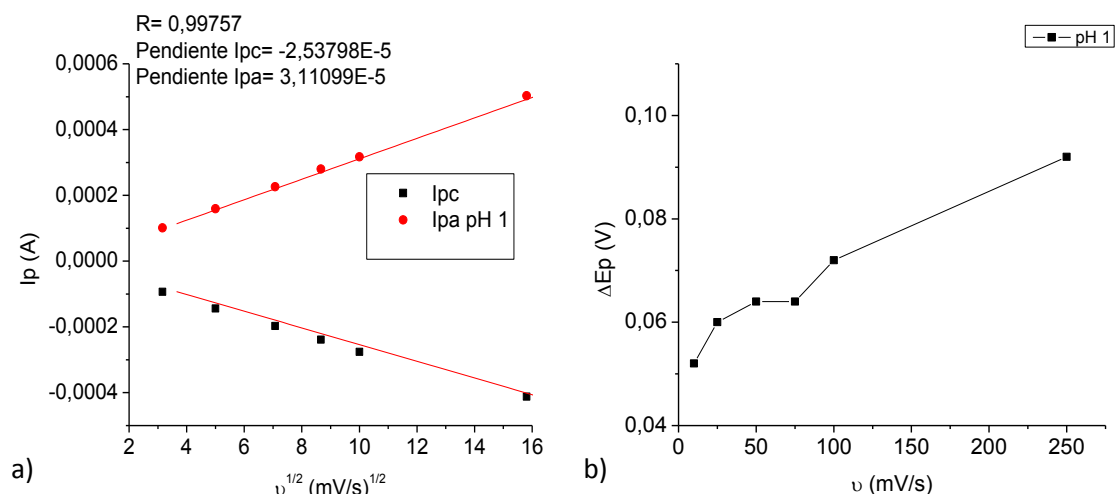
(g) Electrolyte support  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ , pH 8



(h) Electrolyte support  $\text{KCl}/\text{NaOH}$ , pH 12

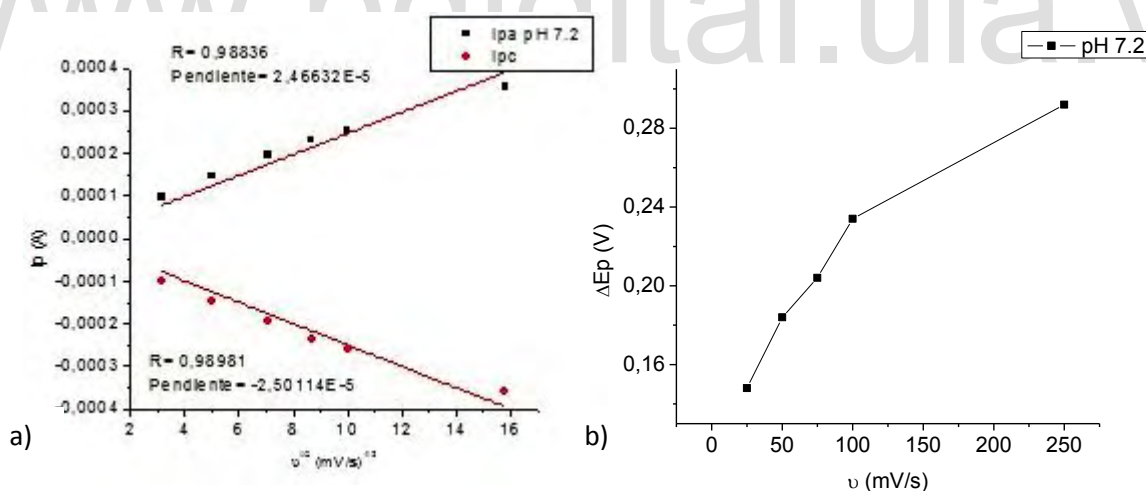
**Figura 33.** Respuesta electroquímica de la especie hidroquinona/quinona a los diferentes pH estudiados en este trabajo.

Los resultados mostrados en la figura 33 permiten establecer que sólo a  $\text{pH}=1$  se obtiene una respuesta voltamperométrica característica de un sistema de transferencia electrónica rápida, mientras que a los otros pHs el sistema se comporta de manera cuasi-reversible, tal y como lo revelan los análisis de la corriente de pico versus la raíz cuadrada de la velocidad de barrido y el análisis de  $\Delta E_p$ , ya que se puede apreciar en la figura 34 (a) muestra que efectivamente la  $I_p$  aumenta con la  $v^{1/2}$  pero no es proporcional a esta y el  $\Delta E_p$  es mayor que 59 mV e incrementa con la velocidad de barrido (figura 34 (b)) adicionalmente la relación  $I_{pa}/I_{pc}$  es aproximadamente 1.



**Figura 34.** (a) Respuesta de  $I_p$  vs  $v^{1/2}$  (b) Respuesta de  $\Delta E_p$  vs  $v$ , ambos necesarios para evaluar la reversibilidad del sistema

El análisis de las respuestas voltamperométricas realizado en buffer fosfato pH 7,2 (figura 35 (a y b)), también muestra una respuesta característica de un sistema cuasi-reversible demostrando lo complejo del sistema quinónico y de ciertas complicaciones con respecto a los mecanismo de transferencia electrónica simple.



**Figura 35.** a) Gráfica de  $I_p$  (anódico y catódico) vs  $v^{1/2}$  ( $\text{mV/s})^{1/2}$  pH 7.2. b) Gráfica de  $\Delta E_p$  vs  $v$  ( $\text{mV/s}$ ) pH 7,2

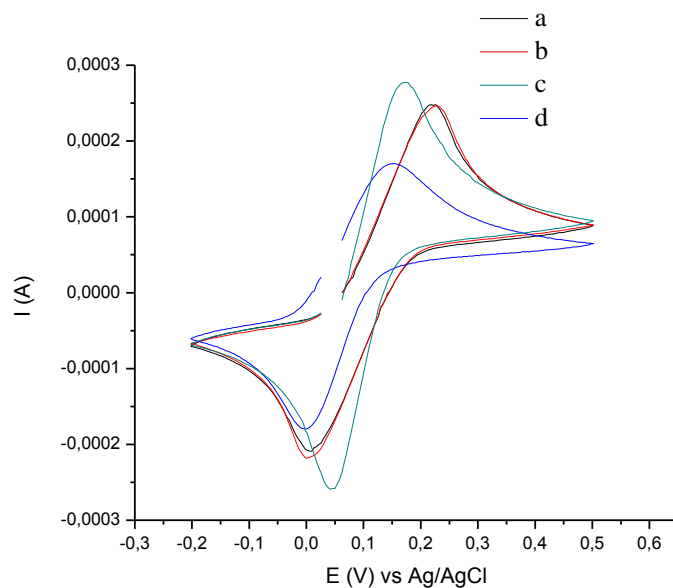
### III-3.3. Optimización de la activación electroquímica

Los electrodos de carbón vítreo activados electroquímicamente presentan una superficie más reproducible, a la vez que mejora la transferencia electrónica y algunas adsorciones específicas<sup>(54)</sup>. Como se indicó anteriormente, la activación de la superficie electródica se puede llevar a cabo en medios ácidos o básicos. En ambos casos se generan

sobre la superficie grupos funcionales oxigenados como hidroxilos, carboxilos y carbonilos, que en muchos casos, favorecen la interacción de las moléculas utilizadas como modificadores con la superficie del electrodo<sup>(63)</sup>. En este trabajo se decidió emplear medios neutros y básicos, para comprobar la efectividad de dichas activaciones, se empleó el sistema hidroquinona/quinona a un pH de 7,2.

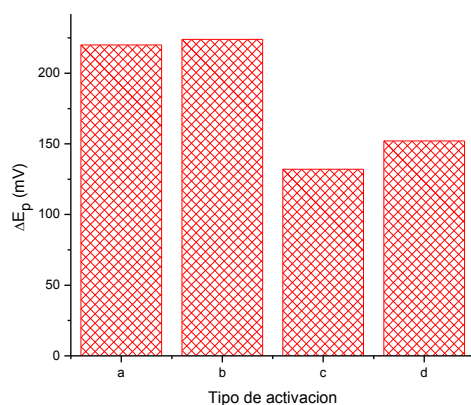
En la figura 36 se muestran cuatro voltagramas superpuestos de una solución de hidroquinona 5 mM en buffer fosfato pH 7,2 empleando el electrodo de carbón vítreo sin activar y activado mediante diferentes métodos, este grupo de voltagramas permite apreciar el efecto producido sobre la respuesta electroquímica. Al analizar los resultados se puede observar que el voltagrama obtenido con el electrodo sin activar (d), presenta corrientes de pico menores en comparación con los demás voltagramas, esto se puede atribuir a que con la activación se oxida la superficie generando grupos funcionales más activos, como de ácidos carboxílicos, en la superficie electroquímica<sup>(64)</sup> que pueden favorecer la transferencia de carga, pudiendo actuar éstos como mediadores redox en procesos electrocatalíticos.

Los resultados de los análisis de los  $\Delta E_p$  de los diferentes tratamientos (a) 220 mV, (b) 224 mV, (c) 132 mV y d) 152 mV indican que la mejor activación, corresponde a la aplicación de un pulso de potencial (activación por cronoamperometría) ya que adicionalmente (figura 37) este tipo de activación induce la obtención de mayores corrientes de pico anódico y catódico. Por tal razón, todos los experimentos realizados a partir de esta sección se llevaron a cabo activando la superficie electroquímica mediante el método (c).



**Figura 36.** Respuestas voltamétricas de una solución de hidroquinona 5 mM en buffer fosfato pH 7,2 sobre una superficie de carbón vítreo sometida a diferentes procesos de activación. a) por voltamperometría cíclica utilizando como electrolito soporte el buffer fosfato pH 7,2 35 ciclos; b) por voltamperometría cíclica utilizando como electrolito soporte NaOH 0,2 M 35 ciclos; c) por cronoamperometría a un potencial de 1,5 V vs Ag/AgCl utilizando como electrolito soporte NaOH 0,2 M durante 60 seg; d) Electrodo sin activar

Estos resultados demuestran que la superficie de carbón vítreo se encuentra activa y funcionando adecuadamente.



**Figura 37.** Variación del  $\Delta E_p$  vs tipo de activación realizada a la superficie de carbón vítreo de acuerdo al tratamiento descrito en la figura 36.

# Capítulo IV

## Resultados y discusión:

### Caracterización del sistema de inmovilización

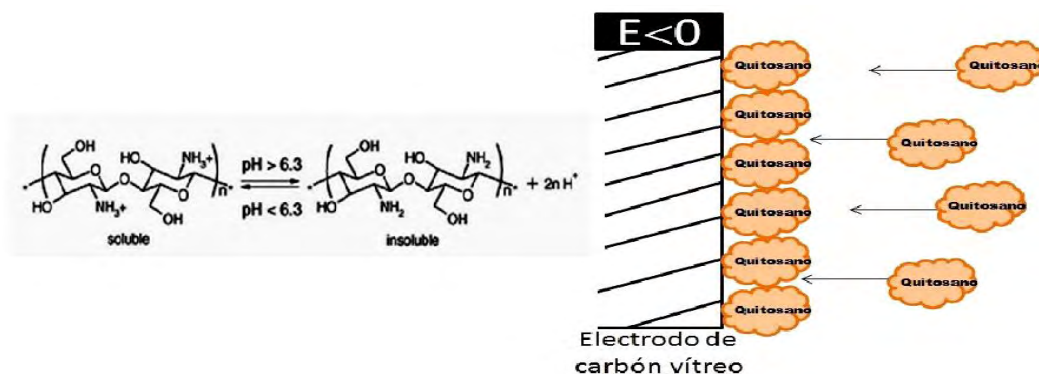
#### **IV-1. Soporte.**

Los intentos por lograr la inmovilización directa de la enzima ureasa sobre la superficie electródica fueron infructuosos, por lo que se debió emplear un sistema de

inmovilización de la enzima que le diera estabilidad mecánica al biosensor, el cual es denominado como soporte. Este soporte permite mejorar la estabilidad de la enzima, aumentar la interacción con el sustrato y además, en algunos casos, sirve para separarla del medio líquido para que pueda ser reutilizada. La elección del soporte y del tipo de enlace que pudiesen generarse entre la enzima y este material resultan determinantes en el comportamiento posterior del biosensor [ (65)- (66)]. En esta investigación se empleó el biopolímero quitosano como sistema soporte para inmovilizar la enzima al transductor, basados en trabajos previos realizados en el laboratorio de Electroquímica de la ULA y en datos mostrados en la literatura general de biosensores.

#### IV-1.1. Modificación de la superficie del electrodo de trabajo con quitosano.

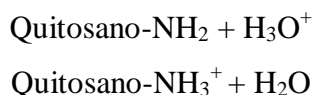
Existen innumerables formas de modificar la superficie de carbón vítreo con quitosano, en esta investigación se realizó una electrodeposición a potenciales catódicos de manera tal de inducir su precipitación en la superficie electródica mediante la generación de un cambio de pH localizado, específicamente aquel que se crea en la interfaz electrodo-solución por la aplicación del potencial de reducción; la figura 38 representa dicho proceso de formación de la película de quitosano.



**Figura 38.** *Representación del proceso que sufre el biopolímero quitosano durante el proceso de electrodeposición catódica.*

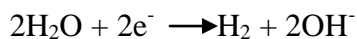
Dicho método fue el empleado para la modificación de la superficie de carbón vítreo. Este proceso de deposición implica tres etapas: <sup>(67)</sup>

- Protonación en solución ácida: etapa en la cual el grupo amino presente en la molécula de quitosano se carga positivamente con los iones  $H^+$  presentes en la solución ácida en la cual se encuentra disuelto.



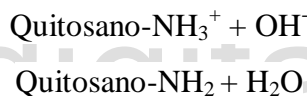
Ecuación 9

- Reacción catódica: reacción de reducción de las moléculas de  $H_2O$  sobre la superficie del cátodo para producir evolución de hidrógeno y grupos  $OH^-$ , los cuales aumentan el pH alrededor del cátodo.



Ecuación 10

- Neutralización del quitosano cargado positivamente y la formación de un depósito insoluble sobre el sustrato catódico.



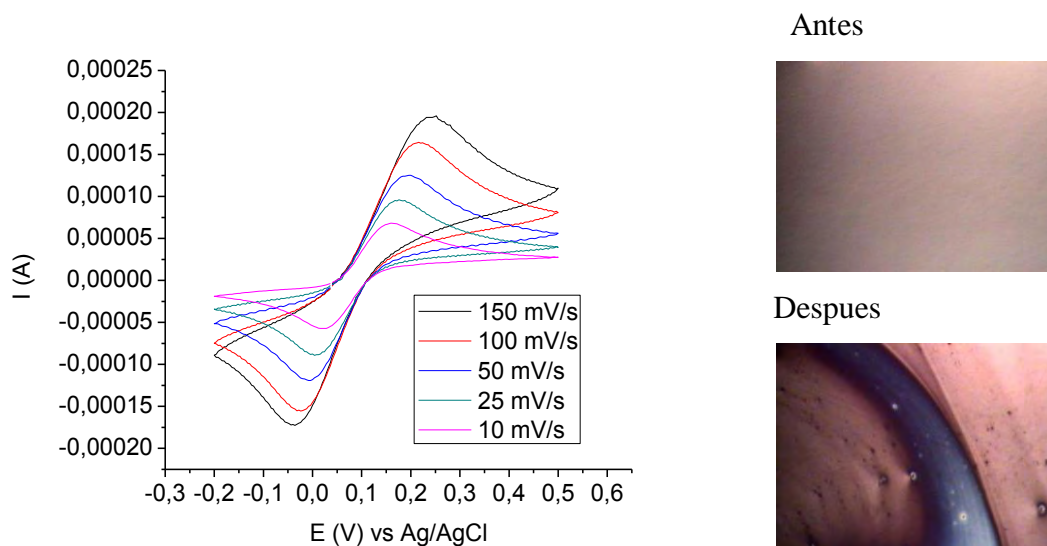
Ecuación 11

Para evaluar el potencial óptimo y el tiempo de deposición del quitosano se realizaron electrólisis potencioestáticas que consistieron en aplicar un pulso de potencial durante un tiempo predeterminado a la superficie de carbón vítreo tratada mecánica y electroquímicamente, el estudio se realizó a un potencial de -1,4 V vs Ag/AgCl a tiempos de 60 y 120 min. Estas películas se caracterizaron tanto por microscopía óptica, debido a que permite observar el estado de la película formada y su estabilidad en la superficie de carbón vítreo, como por voltamperometría cíclica, a través del estudio de la cupla redox hidroquinona/quinona permitiendo de esta forma observar el comportamiento de la superficie electródica antes y después de modificarla.

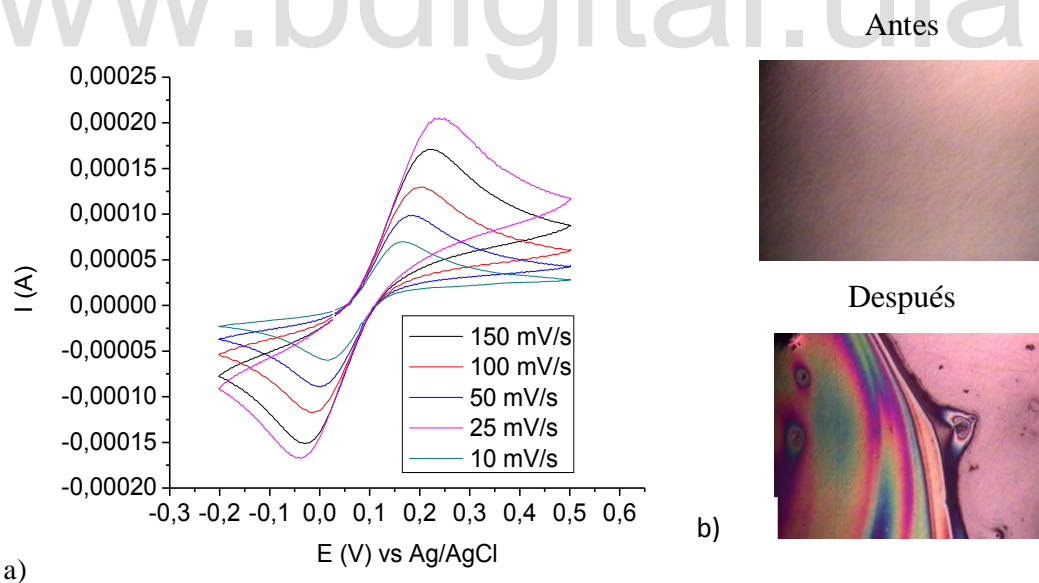
Los resultados de las microscopias ópticas reflejaron que ambas películas generadas a los diferentes tiempos de deposición (figuras 39 (b) y 40 (b)) no son homogéneas, esto se debe a que durante la deposición se libera gran cantidad de hidrógeno que obstruyen la



superficie electródica e impiden que el quitosano precipite de una manera homogénea, generando películas poco reproducibles.



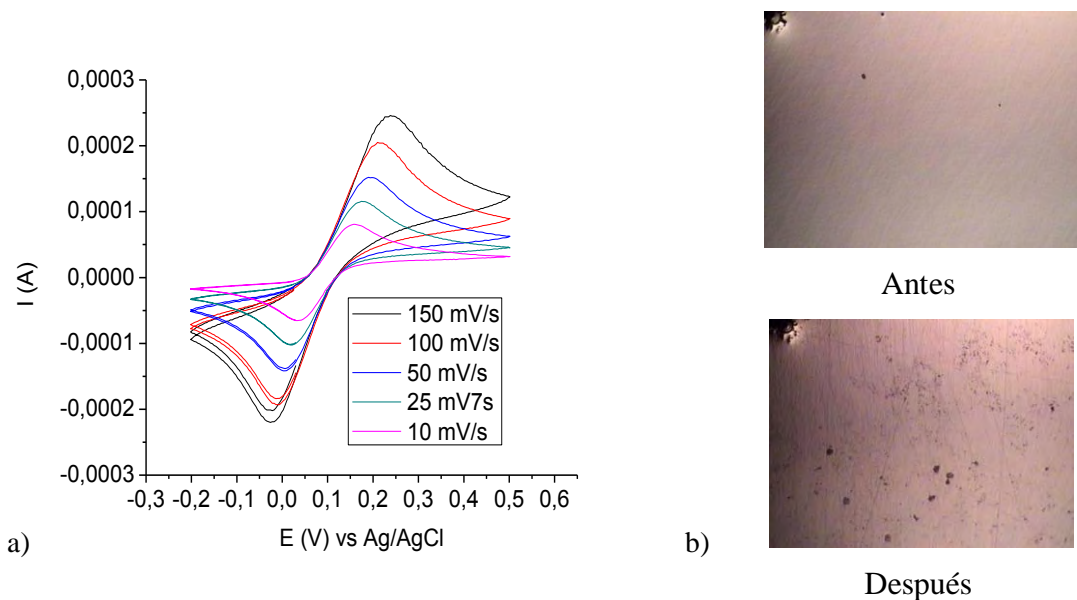
**Figura 39.** (a) Respuesta electroquímica voltamperométrica de la solución de hidroquinona sobre el electrodo modificado con quitosano a un  $E=-1,4$  V a un tiempo de 60 min. (b) microscopia óptica del electrodo de carbón vítreo sin modificación antes (superior) y después (inferior) del electrodo modificado con la película de quitosano.



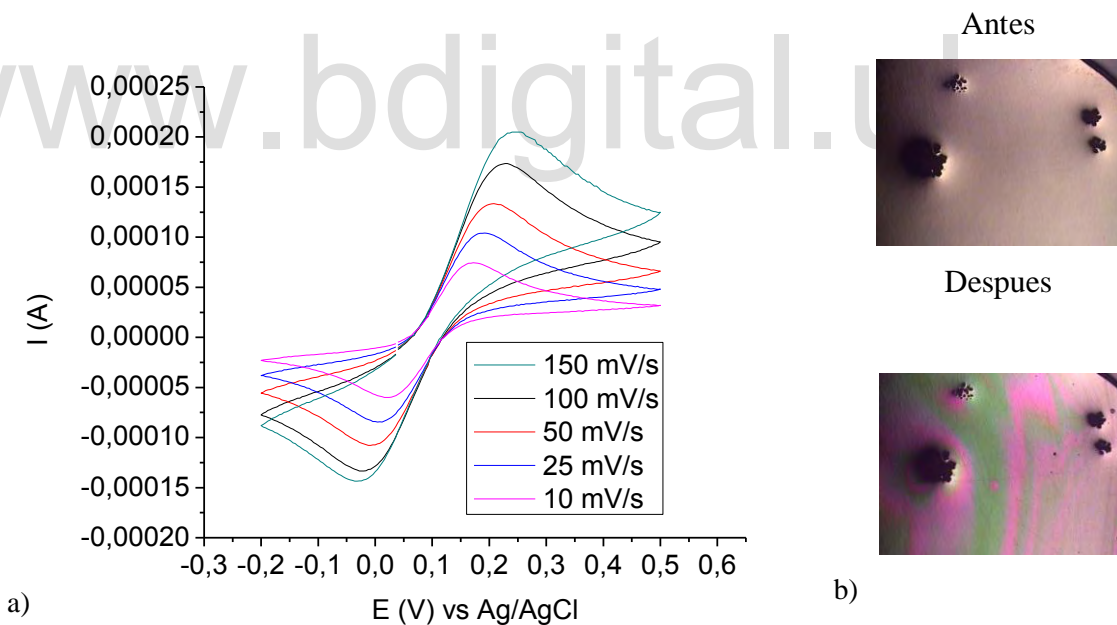
**Figura 40.** (a) Respuesta electroquímica voltamperométrica de la solución de hidroquinona sobre el electrodo modificado con quitosano a un  $E=-1,4$  V a un tiempo de 120 min. (b) microscopia óptica del electrodo de carbón vítreo sin modificación antes (superior) y después (inferior) del electrodo modificado con la película de quitosano.

En las figuras 39 (a) y 40 (a) se muestran los voltamperogramas obtenidos de una solución de hidroquinona a una concentración de 5 mM en buffer fosfato pH 7,2 sobre un electrodo de carbón vítreo modificado con las películas depositadas a los dos tiempos antes mencionados, de estas figuras se puede observar que ambos voltagramas presentan una diferencia de potenciales de pico anódico y catódico bastante amplio, obteniéndose para el primero un  $\Delta E_p$  de 136 mV y para el segundo un  $\Delta E_p$  de 152 mV, cuando ambos se evalúan a una velocidad de barrido de 10 mV/s. Debido a la insatisfacción tanto de los resultados electroquímicos como de la calidad del depósito obtenido se realizó otro estudio modificando el potencial de deposición de quitosano a valores menos catódicos con el objetivo de disminuir la evolución de hidrógeno que es lo que está afectando la formación de una película homogénea de quitosano; el estudio se realizó aplicando un pulso de potencial de -1,2 V vs Ag/AgCl a tiempos de deposición de 30 min, 60 min y 120 min, tiempos de deposición seleccionados basándose en estudios previos realizados en el laboratorio de Electroquímica<sup>(54)</sup>.

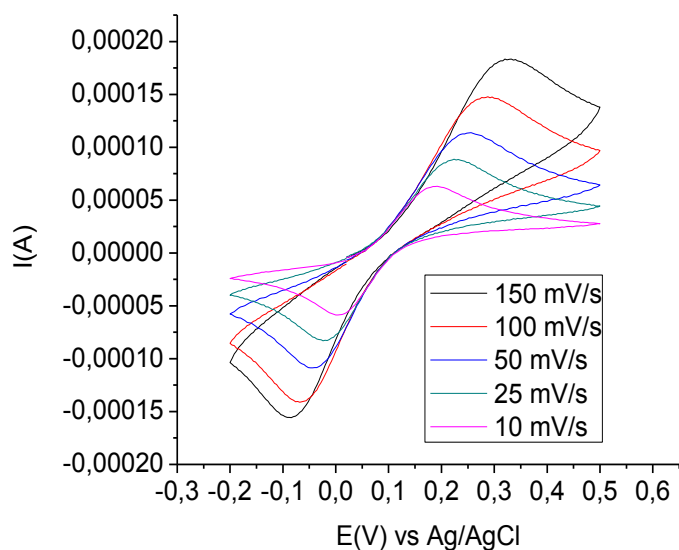
Al realizar la deposición del polímero a los diferentes tiempos (30, 60 y 120 min) se observó en las imágenes obtenidas por microscopia óptica (figuras 41-43 parte (b)) que se presentó el mismo problema que en el caso anterior, la cantidad de burbujas impedían la precipitación del quitosano en la superficie electródica de manera homogénea, por lo que se obtuvieron películas poco reproducibles. Las mismas se caracterizaron igualmente empleando una solución de hidroquinona a una concentración de 5 mM disuelto en buffer fosfato pH 7,2, los voltamperogramas obtenidos se muestran en la figura 41-43 parte (a). De la que se aprecia que a medida que incrementa el tiempo de deposición de quitosano aumenta el diferencial de potencial de pico, obteniéndose un  $\Delta E_p$  de 124 mV, 156 mV y 188 mV, para las películas resultantes a 30, 60 y 120 minutos respectivamente (todas evaluadas a una velocidad de barrido de 10 mV/s), resultados estos muy diferentes valor que teóricamente se debería obtener que es de 59 mV. A pesar que las películas fueron un poco más uniformes, el incremento en el tiempo de deposición favorece la formación de las burbujas de hidrógeno que tienden a perturbar la estabilidad mecánica de las películas, adicionalmente, tiempos más largos generaron películas poco reproducibles en intentos posteriores por reproducir los resultados.



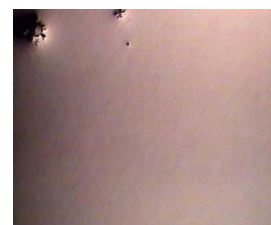
**Figura 41.** (a) Respuesta electroquímica voltamperométrica de la solución de hidroquinona sobre el electrodo modificado con quitosano a un  $E = -1,2$  V a un tiempo de 30 min. (b) microscopia óptica del electrodo de carbón vítreo sin modificación antes (superior) y después (inferior) del electrodo modificado con la película de quitosano.



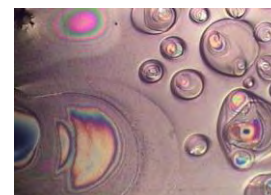
**Figura 42.** (a) Respuesta electroquímica voltamperométrica de la solución de hidroquinona sobre el electrodo modificado con quitosano a un  $E = -1,2$  V a un tiempo de 60 min. (b) microscopia óptica del electrodo de carbón vítreo sin modificación antes (superior) y después (inferior) del electrodo modificado con la película de quitosano.



a)



Antes

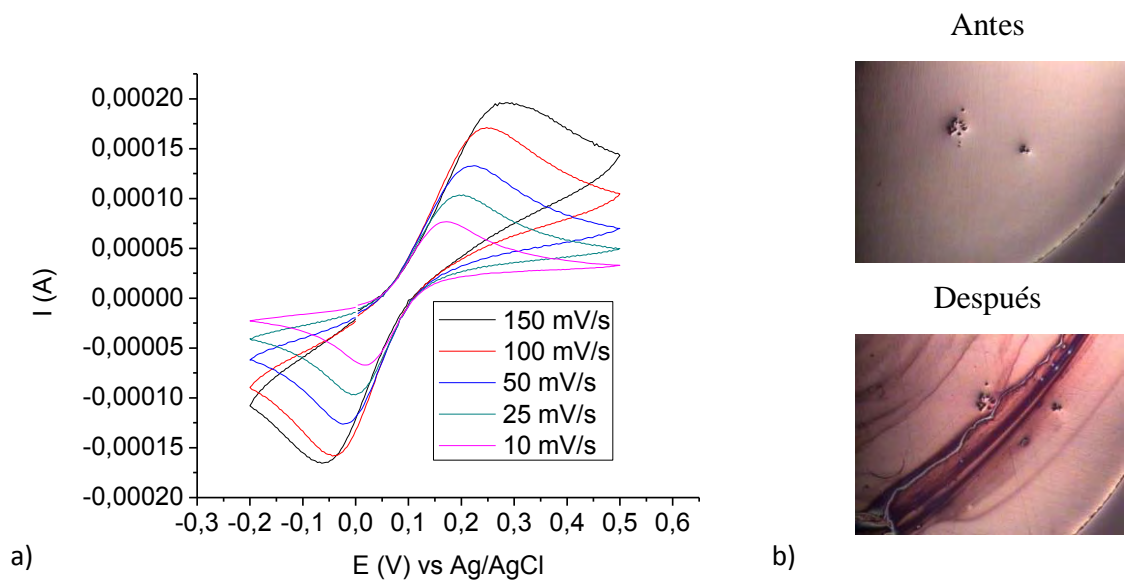


Despues

b)

**Figura 43.** (a) Respuesta electroquímica voltamperométrica de la solución de hidroquinona sobre el electrodo modificado con quitosano a un  $E = -1,2$  V a un tiempo de 120 min. (b) microscopía óptica del electrodo de carbón vítreo sin modificación antes (superior) y después (inferior) del electrodo modificado con la película de quitosano.

En vista de estos resultados, se decidió emplear un potencial menos catódico para la deposición de la película de quitosano, seleccionando  $-1,15$  V a un tiempo de 120 min, se puede observar en la figura 44 (b) obtenida por microscopía óptica, que la película es homogénea, sin embargo la respuesta electroquímica del electrodo modificado con esta película en la solución de hidroquinona (figura 44 (a)) arrojó un  $\Delta E_p$  de 156 mV muy similar a los obtenidos anteriormente, sin embargo al realizar el experimento por triplicado se obtuvo una película reproducible, por lo que se tomó este potencial como el potencial óptimo de deposición de quitosano para posteriormente inmovilizar la enzima ureasa. (Ensamblaje del biosensor).



**Figura 44.** (a) Respuesta electroquímica voltamperométrica de la solución de hidroquinona sobre el electrodo modificado con quitosano a un  $E = -1,15$  V a un tiempo de 120 min. (b) microscopía óptica del electrodo de carbón vítreo sin modificación antes (superior) y después (inferior) del electrodo modificado con la película de quitosano.

www.bdigital.ula.ve

# Capítulo V

## Resultados y discusión:

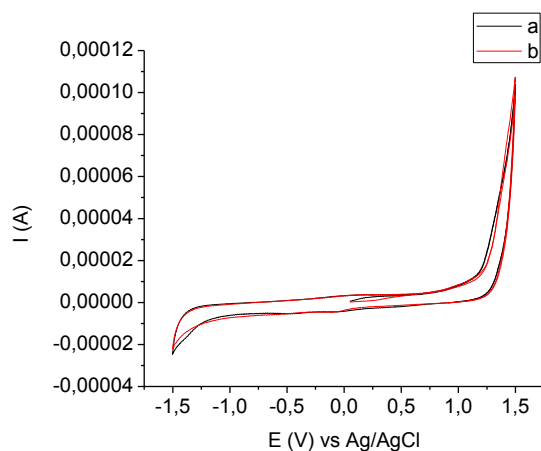
### Ensamblaje del biosensor

## V-1. Biosensor amperométrico.

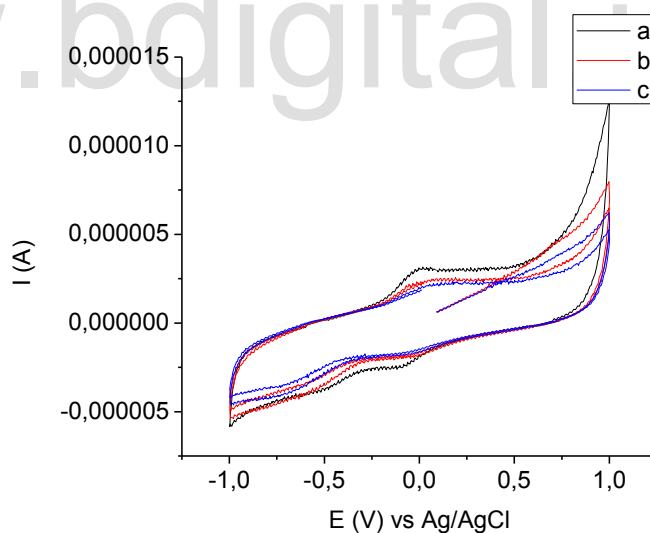
Con la finalidad de proporcionarle estabilidad mecánica y química al sistema de reconocimiento biológico (enzima) se procedió a optimizar el proceso de inmovilización de la ureasa sobre la superficie del transductor empleando películas de quitosano electrodepositadas sobre la superficie de carbón vítreo. Existen diversas formas de inmovilización del elemento de reconocimiento biológico al transductor que dependen, entre otros parámetros, de la solubilidad y del tipo de interacción que se genera entre la enzima y el soporte. En esta investigación, inicialmente se empleó un método de adsorción física directa de la enzima, la cual se llevó a cabo adicionándole alícuotas de la solución de la enzima de forma directa sobre la superficie electrodo modificada, para ello se incorporaron diferentes volúmenes de la solución de ureasa sobre la superficie del transductor previamente modificado con las películas de quitosano, esto se realizó con el objetivo de evaluar la posible señal voltamperométrica de la enzima o de los productos de reacción de la ureasa con su sustrato y de esta manera intentar desarrollar un sensor amperométrico al identificar una señal característica de este proceso.

En la figura 45 se muestra el voltamperograma de la solución 10 mM de urea empleando el electrodo de carbón vítreo modificado con 30  $\mu\text{L}$  y 40  $\mu\text{L}$  de ureasa inmovilizada respectivamente; como se puede observar las respuestas en corriente obtenidas para ambas soluciones son similares y no se aprecian diferencias importantes entre cada respuesta voltamperométrica, además estas respuestas coinciden con las reportadas para el electrolito soporte discutidas anteriormente, siendo consideradas como corrientes capacitivas debido a que no se produce una transferencia electrónica del analito. Incrementos en el contenido de la enzima ureasa en la superficie electrodo no arrojaron resultados diferentes en la búsqueda de una señal producida por una transferencia electrónica del sistema urea-ureasa (figura 46), por el contrario se observa es una disminución de las corrientes generado por el posible bloqueo producido sobre la superficie electrodo ocasionado por la ureasa inmovilizada, estos resultados permiten concluir que ni la urea ni los productos que se generan en su hidrólisis son electroactivos, resultados que se ven incrementados cuando se aumenta la concentración de urea en estudio a 50 mM. La pequeña señal apreciada en aproximadamente 0 V vs Ag/AgCl (nótese las bajas corrientes),

es atribuida a los grupos quinónicos e hidroquinónicos presentes en la superficie de carbón vítreo y no a procesos propios del analito o su descomposición.



**Figura 45.** (a) Respuesta voltamperométrica cíclica de una solución 10 mM de urea sobre una superficie de carbón vítreo modificado con la película de quitosano e incorporando 30  $\mu\text{L}$  de ureasa comercial (b) Respuesta voltamperométrica cíclica de una solución de hidroquinona sobre una superficie de carbón vítreo modificado con la película de quitosano e incorporando 40  $\mu\text{L}$  de ureasa comercial.

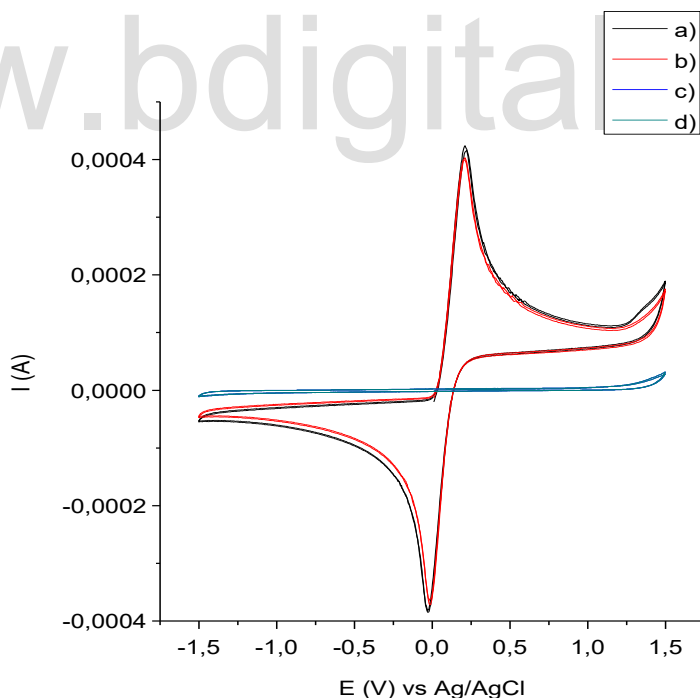


**Figura 46.** (a) Respuesta voltamperométrica cíclica de una solución 10 mM de urea sobre una superficie de carbón vítreo modificado con la película de quitosano e incorporando 50  $\mu\text{L}$  de ureasa comercial (b) incorporando 70  $\mu\text{L}$  de ureasa comercial. (c) incorporando 90  $\mu\text{L}$  de ureasa comercial.



### V-1.1 Respuesta electroquímica de la urea utilizando el electrodo de carbón vítreo modificado con quitosano-ureasa, utilizando como mediador la especie hidroquinona.

La figura 47 muestra cuatro voltamperogramas superpuestos correspondientes al carbón vítreo modificado con quitosano y 70 $\mu$ L de ureasa comercial, este grupo de voltogramas nos permite evaluar el efecto producido sobre la respuesta electródica por la incorporación una especie electroactiva externa (hidroquinona). Como era de esperarse la respuesta del blanco y de la urea no genera una respuesta voltamperométrica importante dado a que, bajo las condiciones estudiadas, la urea no es electroactiva. Sin embargo, los voltamperogramas obtenidos para la solución de hidroquinona y para la solución de urea con hidroquinona son similares, esto confirma nuevamente que la solución de urea no es electroactiva, además que no se produjo una transferencia electrónica que se pudiera atribuir a la enzima o a cualquier producto generado de la reacción enzimática aún en presencia de un mediador como la hidroquinona.



**Figura 47.** Respuesta voltamperométrica cíclica de: (a) solución de Hidroquinona 10 mM sobre un electrodo modificado con una película de quitosano; (b) solución de hidroquinona 10 mM y 70  $\mu$ L de ureasa comercial sobre el electrodo de carbón vítreo modificado con quitosano; (c) solución buffer fosfato pH 7,2 (blanco); (d) solución de Urea 50 mM en buffer fosfato pH 7,2

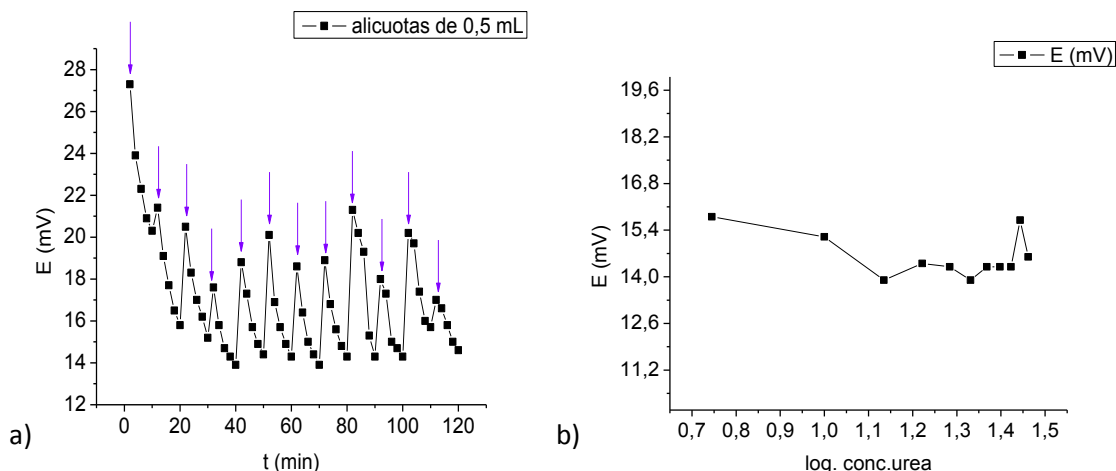
Estos resultados conducen a concluir que bajo las condiciones estudiadas no es posible construir un biosensor amperométrico para urea empleando un electrodo modificado con quitosano y ureasa.

Por esta razón se planteó la posibilidad de evaluar un biosensor potenciométrico para detectar urea empleando el electrodo de carbón vítreo modificado con quitosano y la ureasa inmovilizada mediante diferentes métodos.

## **V-2. Biosensor potenciométrico.**

Este tipo de biosensores permiten monitorizar los cambios de potencial que se producen entre el electrodo indicador (electrodo de trabajo) y el electrodo de referencia (de potencial estable y conocido) con el incremento de la concentración del analito<sup>[(68)-(69)]</sup>. En este trabajo los primeros estudios fueron realizados evaluando la respuesta del potencial en el tiempo de la superficie electródica sin modificar de manera tal de observar si el propio electrodo responde a las adiciones sucesivas de urea, esto con el fin de descartar que los potenciales que se obtengan luego con la enzima ureasa no se pudiesen atribuir a la superficie electródica desnuda.

La figura 48 muestra la respuesta potenciométrica obtenida sobre el electrodo de carbón vítreo sin modificar con adiciones cada 10 min de una solución 50 mM de urea, pudiéndose observar que el electrodo no responde potenciométricamente al incremento de la concentración de urea mostrando una respuesta estable, lo cual es indicativo que no se producen cambios significativos del potencial de circuito abierto con los cambios de la concentración del analito en la interfaz electrodo-solución; los incrementos de potencial que se observan luego de cada adición de la alícuota de la solución de urea se debe a la perturbación generada por la agitación de la solución, la cual rompe el equilibrio previamente formado, tendiendo a estabilizarse en el tiempo.



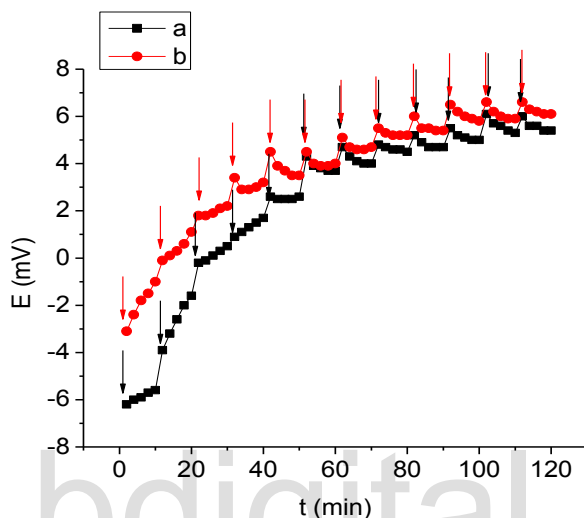
**Figura 48.** a) Respuesta potenciométrica del electrodo de carbón vítreo sin modificar en presencia de una solución de urea en medio buffer fosfato pH 7,2. b) Gráfica de  $E$  vs  $\log.\text{conc.urea}$  del electrodo de carbón vítreo sin modificación.

Una vez verificado que el electrodo desnudo no responde potencioméricamente a los cambios en la concentración de la solución de urea, se estudió la respuesta potenciométrica de la solución de urea empleando el electrodo modificado con quitosano y quitosano-ureasa.

### V-2.1. Superficies de carbón vítreo modificado con quitosano y ureasa comercial.

En la figura 49 se muestra la respuesta potenciométrica del electrodo modificado con quitosano y del electrodo modificado con una película de quitosano a la cual se le incorporó 70  $\mu\text{L}$  de ureasa comercial. Como se puede apreciar de esta figura, ambas respuestas presentan un comportamiento ascendente con las adiciones sucesivas de la solución de urea 50 mM; el aumento en la respuesta del potencial se atribuye a los cambios en la composición de la solución lo cual genera un gradiente de concentración dentro y fuera de la película de quitosano induciendo un desplazamiento en la diferencia potencial (tal y como lo predice la ecuación de Nernst); por otro lado, la diferencia en los potenciales iniciales de ambas respuestas es un claro indicativo de la presencia de ureasa en la película de quitosano, además el electrodo que incluye la enzima responde más rápido aunque ambas curvas tienden a superponerse a altas concentraciones de urea. Esta coincidencia en ambas curvas pudiese ser indicativo de un proceso de saturación por parte de la ureasa que tiende a inhibir la hidrólisis de la urea en la interfaz del electrodo modificado con la película de quitosano y la ureasa, o a que la concentración de ureasa superficial disponible

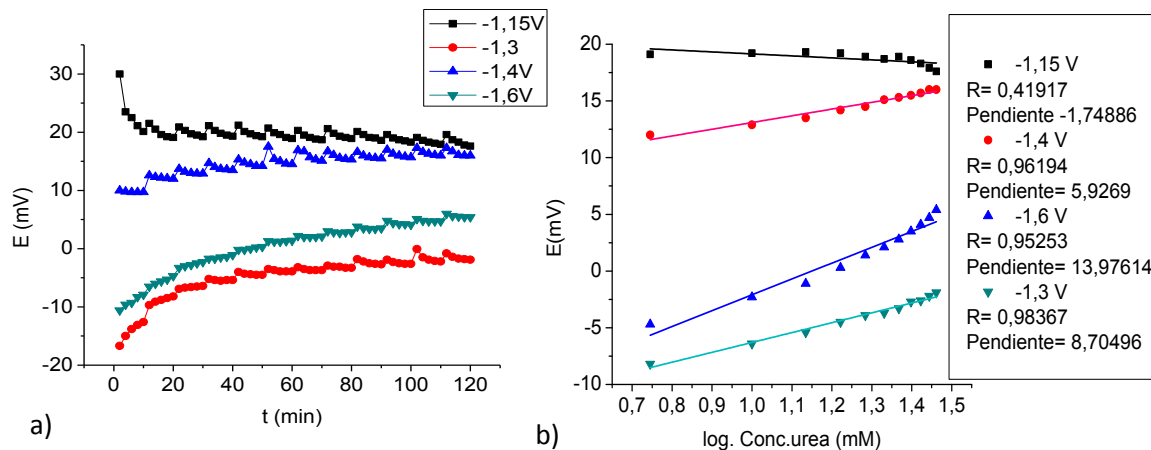
para la interacción con la urea sea insuficiente por la simple distribución de ésta al azar sobre la superficie y/o a pérdida de la enzima hacia la solución debido a un proceso de inmovilización inadecuado. En un intento por evaluar la pérdida de enzima del electrodo modificado se evaluaron estas soluciones a través del método colorimétrico de Nessler comprobando la presencia del complejo de color amarillo característico de la enzima comprobando la pérdida de la misma en el tiempo.



**Figura 49.** Respuesta potenciométrica del electrodo de carbón vítreo modificado con: a) quitosano en una solución de urea. b) quitosano incorporando 70  $\mu\text{L}$  de ureasa comercial en una solución de urea.

En virtud de estos resultados se modificaron las condiciones experimentales inmovilizando la ureasa simultáneamente con el quitosano mediante electrodeposición para así minimizar su lixiviación, para la electrodeposición del quitosano se empleó una solución a pH 4.

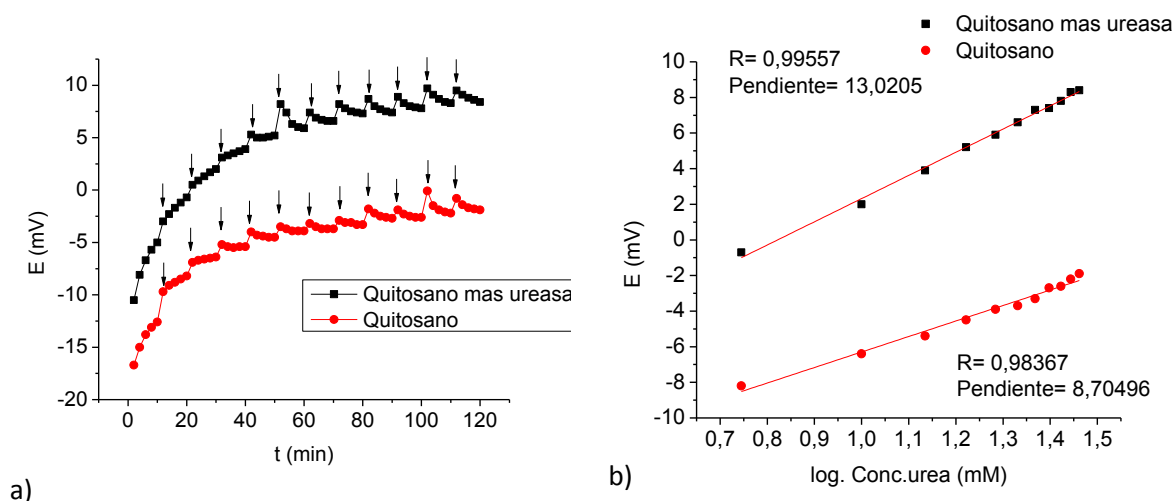
La figura 50 muestra las respuestas potenciométricas así como la variación del potencial versus la concentración de urea para las diferentes películas de quitosano depositadas sobre el electrodo de carbón vítreo.



**Figura 50.** (a) Respuesta potenciométrica del electrodo de carbón vítreo modificado con películas de quitosano depositadas a diferentes potenciales, (b) gráfica de E vs log concentración de urea de las diferentes películas de quitosano.

Del análisis de la figura “a” se aprecia que la película depositada a -1,15 V no respondió a las adiciones de las alícuotas de urea y se comportó de una manera estable arrojando una respuesta similar a la obtenida con el electrodo desnudo (figura 48), lo cual demuestra la película no es lo suficientemente gruesa y estable como para responder a los cambios de concentración de urea, lo cual es indicativo que se requiere emplear potenciales más catódicos. Por otro lado, las respuestas potenciométricas obtenidas a un potencial de -1,3 V, -1,4 V y -1,6 V respondieron a las adiciones de urea, tal y como se observa de la figura 49 “b”, generando respuestas lineales del E vs logaritmo de la concentración de urea, encontrándose que las películas que generan mayor sensibilidad (mayor pendiente) son las formadas a -1,3 V y -1,6 V, adicionalmente estas películas fueron mecánicamente más estables y reproducibles. Sin embargo, la mejor respuesta lineal se obtiene a -1,3 V con un coeficiente de determinación lineal de 0,9837 por lo que se tomó este potencial como el óptimo para la formación de la película en los experimentos posteriores.

Los electrodos modificados con ureasa y quitosano (sección II.8) fueron evaluados mediante adiciones sucesivas de urea 50 mM y registrando el potencial en el tiempo. Experimentalmente se encontró que los electrodos modificados deben permitirse estabilizar por 90 minutos previo al proceso de medición, ya que durante la deposición de quitosano el electrodo es sometido a una perturbación externa que lo aleja de su estado de equilibrio.

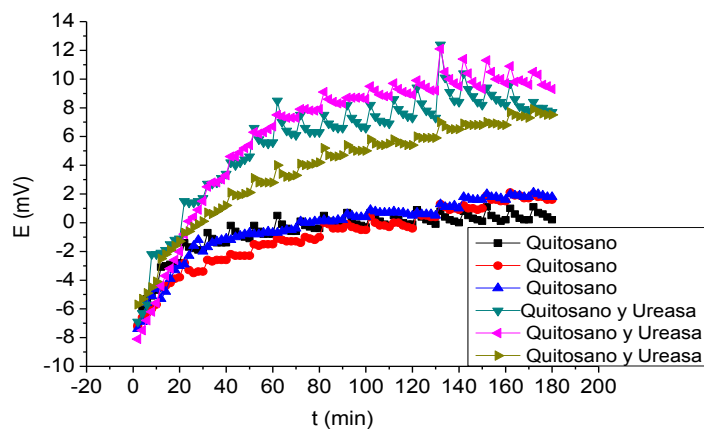


**Figura 51.** (a) Respuesta potenciométrica del electrodo modificado con quitosano (traza roja) y quitosano + ureasa (trazo negro) en presencia de alícuotas de soluciones de urea 50 mM. (b) Gráfica de E vs log.conc.urea del electrodo modificado con quitosano y con quitosano + ureasa.

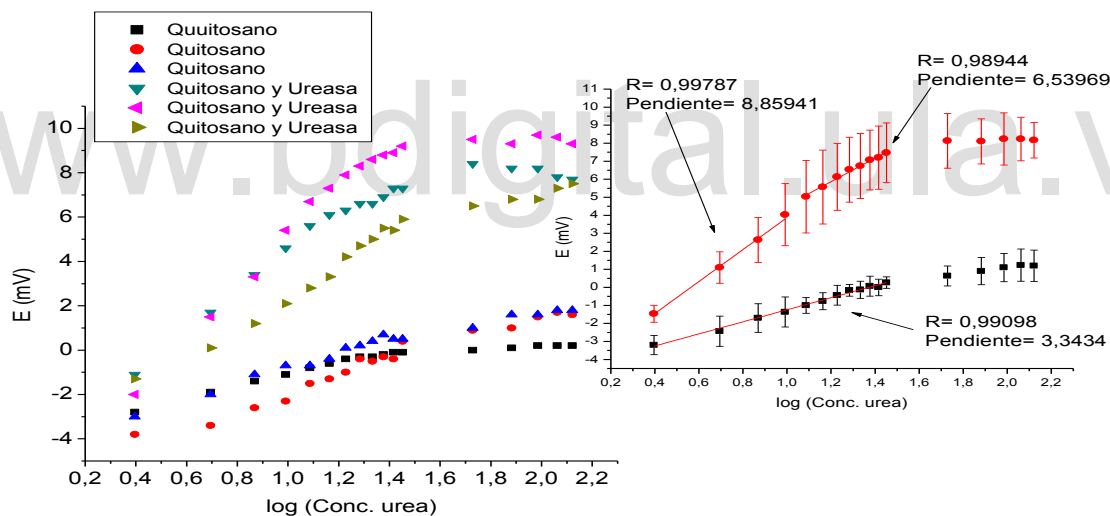
La figura 51 (a) muestra la respuesta potenciométrica de los electrodos de carbón vítreo modificados con quitosano y quitosano junto con la enzima ureasa en presencia de un contenido creciente de urea. Estos electrodos respondieron rápidamente aunque el electrodo modificado con ureasa generó los cambios de potencial más altos llegando a saturarse a tiempo más largo que el electrodo sin ureasa, tal y se aprecia de la figura 51 “a”. La gráfica (b) de la figura 51, muestra que el biosensor presenta una respuesta lineal frente al logaritmo de la concentración de urea lo que confirma la incorporación de la ureasa en el electrodo, así como también que la misma cataliza la hidrólisis de la urea lo cual es reflejado como un aumento de la pendiente para el sistema que contiene la ureasa, desafortunadamente el rango dinámico lineal de concentraciones es muy pequeño y pudiese estar relacionado con la concentración de urea empleada. Por esta razón se realizaron estudios a mayores concentraciones de urea (de 50 mM a 500 mM) disminuyendo de esta forma el volumen de las alícuotas a 0,02 mL para un intervalo de concentración de (2,49 a 28,30 mM) y de 0,24 mL para un intervalo de concentración de 53,57 mM a 132,35 mM.

La figura 52 “a” muestra la misma tendencia obtenida previamente en cuanto a que la presencia de ureasa en el electrodo genera potenciales más altos b. La gran dispersión de puntos con estos electrodos está asociado a la no distribución homogénea de la enzima en

el electrodo a pesar que el proceso de deposición es bien controlado si se compara con las respuestas obtenidas para el electrodo modificado con quitosano (respuestas con menor dispersión).



a)



b)

**Figura 52.** (a) Respuesta potenciométrica de la urea utilizando el electrodo de carbón vítreo modificado con quitosano y quitosano/ureasa. (b) Gráfica de  $E$  vs  $\log$  conc.urea de los electrodos modificados con quitosano y con quitosano/ureasa, se reporta el valor promedio con su barra de error para  $n=3$

Las respuestas potenciométricas de estos electrodos en la solución de urea son casi idénticas a las obtenidas previamente para el caso de bajas concentraciones de urea, pudiéndose apreciar en la curva dos conjuntos de datos lineales a un intervalo de

concentración de 2,49 mM a 9,8 mM con una pendiente de 8,86 mV y el otro a un rango de concentración de 12,19 mM a 28,3 mM con una pendiente de 6,54 mV, este cambio se debe a que los centros activos que estaban más expuestos en la superficie electródica tienden a saturarse rápidamente y el exceso de sustrato, posteriormente, puede llegar a reaccionar con los centros activos restantes hasta que llega un punto en el que las medidas de potencial se mantienen constante, ya sea porque alcanzó la saturación de la enzima o a que la enzima ureasa se lixivió.

Este biosensor figura 52“b” mostró un buen ajuste lineal por mínimos cuadrados con un coeficiente de correlación lineal ( $R_1= 0,99787$  y el  $R_2= 0,98944$ ).

### **V-3. Modificación de la superficie del electrodo de trabajo con quitosano y nanopartículas de oro.**

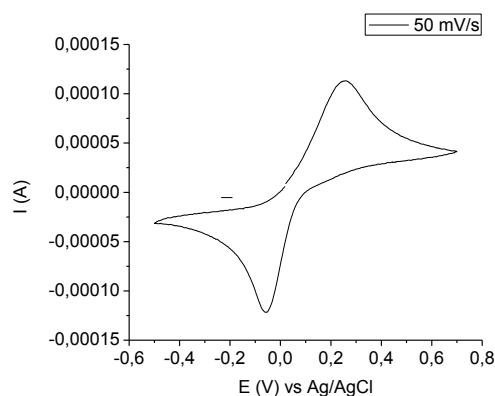
En la actualidad se han venido realizando biosensores modificados con nanomateriales electroconductores generando de esta forma una mejora en las propiedades electroanalíticas y en la estabilidad de estos dispositivos <sup>(70)</sup>, uno de estos nanomateriales que especialmente han despertado un gran interés corresponde a las nanopartículas de oro, debido a que las mismas presentan propiedades superficiales, estructurales electrónicas, magnéticas, ópticas y catalíticas únicas de este material. Entre ellas destaca su capacidad para absorber proteínas sin que se vea afectada su actividad biológica, estas nanopartículas interaccionan con los centros activos de las enzimas y facilitan el transporte de electrones hacia la superficie del electrodo.

Dadas las propiedades de estos materiales se decidió incorporar nanopartículas de oro a las películas de quitosano en la búsqueda por mejorar las respuestas obtenidas en la figura 52. Para ello, inicialmente se realizó un estudio para identificar el mejor método de inmovilización de las nanopartículas de oro y quitosano siguiendo los procedimientos indicados en la sección II-9.

La uniformidad de las películas obtenidas mediante los métodos de inmovilización fueron evaluadas por microscopia óptica usando un microscopio óptico Nikon/DIAPHOT300 y por voltametría cíclica empleando como sonda de prueba la hidroquinona dado que este compuesto debe generar respuestas electroquímicamente reversibles



características de sistemas de transferencia electrónica rápida ( $\Delta E_p=59$  mV y  $I_a/I_c=1$ ); en las figuras 53 y 54 (parte a) se muestran las voltamperometrías cíclicas de la solución de hidroquinona a una concentración de 5 mM obtenida con el electrodo modificado por el método II.9 (1) y método II.9 (3), las cuales generaron un  $\Delta E_p$  de 308 mV y de 196 mV respectivamente, lo cual es indicativo que estos procesos generan respuestas resistivas que dificultan la transferencia electrónica e implican que los procesos para la incorporación de las nanopartículas no son los adecuados ya que dificultan la transferencia electrónica entre la hidroquinona y la superficie electródica. La figura 53 muestra la fotografía por microscopía óptica de la superficie electródica luego del proceso de deposición (previo al análisis por voltamperometría cíclica) y posterior a la evaluación voltamperométrica, respuestas las cuales confirman la formación de una película fina pero uniforme con pequeñas zonas con un exceso localizado de cúmulos de nanopartículas de oro. Una vez realizado el experimento electroquímico se observa cómo se “levanta” la película casi en su totalidad perdiendo su estabilidad mecánica, lo cual justifica los altos valores en los  $\Delta E_p$ . La figura 54 parte b muestra que el electrodo modificado por el método 3 propicia la formación de una película muy fina que en el transcurso del estudio de la cupla redox causó que la película presentara filtración dado que pierde adherencia en los bordes de la superficie electródica (reflejado por los cambios de color), además la película tiende a desprenderse y ocurre un proceso de filtración el cual es responsable de la disminución del  $\Delta E_p$ , ya que parte de la solución se pone en contacto directo con la superficie electródica. Estos resultados permiten concluir que las películas obtenidas por estos procedimientos no son adecuadas ya que generan voltamperogramas con una diferencia de potencial y de pico anódico y catódico muy amplio, lo que señala una transferencia electrónica lenta, además las películas no son mecánicamente estables, tal y como se refleja en las imágenes obtenidas por microscopía óptica.



Método II.9 (1)

a)

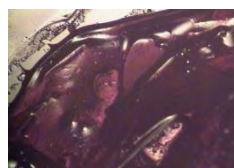
Antes de estudiar la cupla redox

hidroquinona/quinona



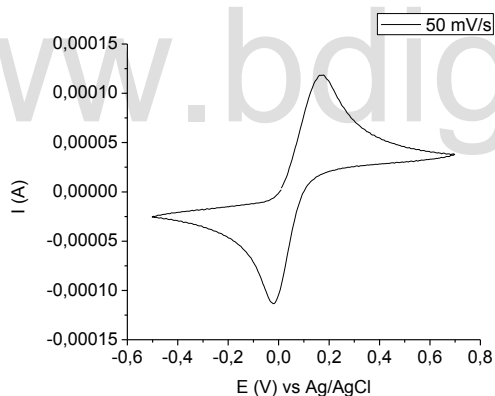
Después de estudiar la cupla redox

hidroquinona/quinona



b)

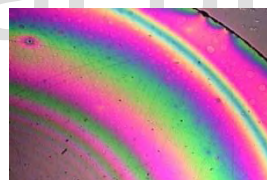
**Figura 53.** a) Respuesta electroquímica voltamperométrica de la solución de hidroquinona sobre el electrodo modificado por el procedimiento II.9 (1). b) Microscopia óptica del electrodo de carbón vítreo modificado con quitosano y nanopartículas de oro antes (superior) y después (inferior) de realizar los experimentos voltamperométricos.



a) Método II.9 (3)

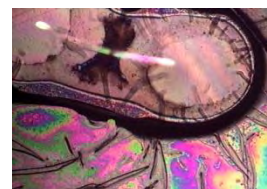
Antes de estudiar la cupla redox

hidroquinona/quinona



Después de estudiar la cupla redox

hidroquinona/quinona

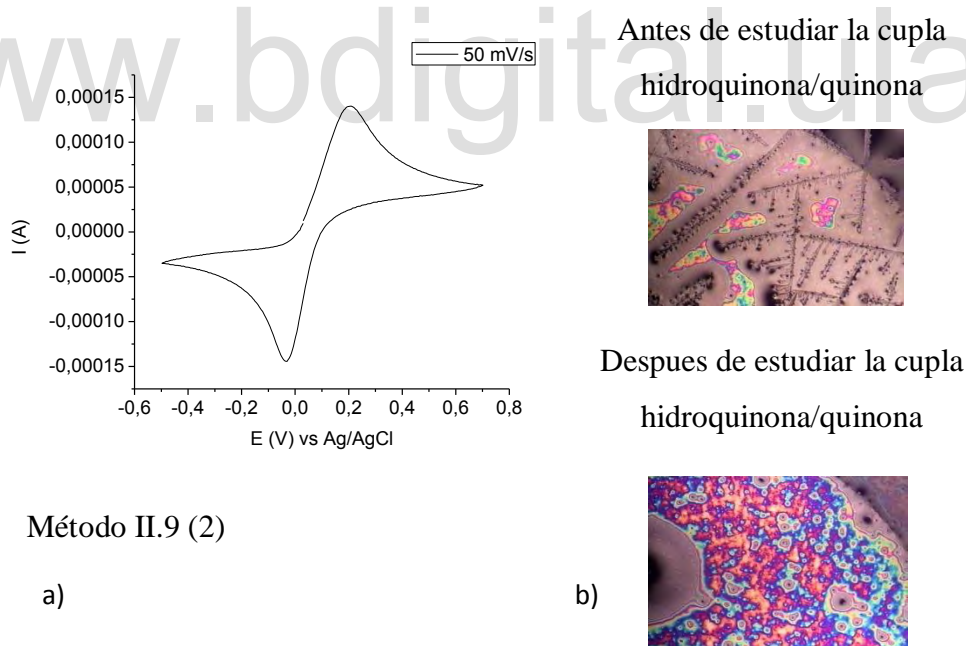


b)

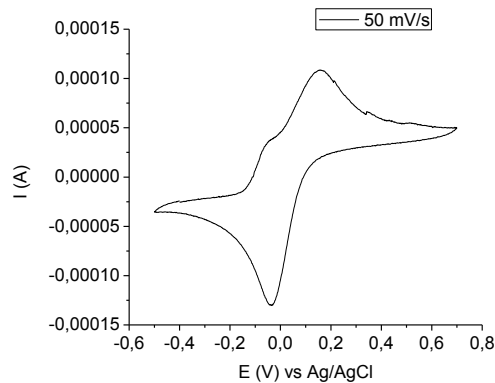
**Figura 54.** a) Respuesta electroquímica voltamperométrica de la solución de hidroquinona sobre el electrodo modificado por el procedimiento II.9 (3). b) Microscopia óptica del electrodo de carbón vítreo modificado con quitosano y nanopartículas de oro antes (superior) y después (inferior) de realizar los experimentos voltamperométricos.

En el caso del método II-9 (2) y II-9 (4) (sección experimental II-9 b y d) se muestra los voltamperogramas obtenidos en la figura 55 (a) y la figura 56 (a), encontrándose para el método II-9 (2) que la cupla redox hidroquinona/quinona presenta un

$\Delta E_p$  de 236 mV y para el método II.9 (4) un  $\Delta E_p$  de 196 mV. Estas diferencia de los potenciales de pico anódico catódico son menores en comparación con los obtenidos por el método II.9 (1) y método II.9 (3). Las películas se evaluaron también por la técnica de microscopia óptica, para el caso de la película formada mediante el método II.9 (2) (figura 55 (b)) se observa una película fina con pequeñas grietas, que luego de realizar el estudio voltamperométrico se puede notar que absorbió humedad pero no en exceso, ya que la misma se sigue manteniendo en la superficie electrodo. Para el método II.9 (4) se puede apreciar (figura 56 (b)) que se obtienen películas homogéneas con un exceso localizado de cúmulos de nanopartículas de oro, además la misma se mantiene adherida a la superficie electrodo aún después de realizar las experiencias voltamperométricas, por esta razón se emplearon ambos métodos para realizar las medidas potenciométricas de la solución de urea, dado que las mismas presentaban una estabilidad mecánica y física que les permitió mantenerse estables en la superficie del transductor aun después de realizados los estudios voltamperométricos.

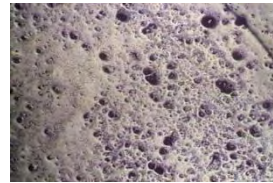


**Figura 55.** a) Respuesta electroquímica voltamperométrica de la solución de hidroquinona sobre el electrodo modificado por el procedimiento II.9 (2). b) Microscopia óptica del electrodo de carbón vítreo modificado con quitosano y nanopartículas de oro antes (superior) y después (inferior) de realizar los experimentos voltamperométricos.



Antes de estudiar la cupla

hidroquinona/quinona



Después de estudiar la cupla

hidroquinona/quinona



Método II.9 (4)

a)

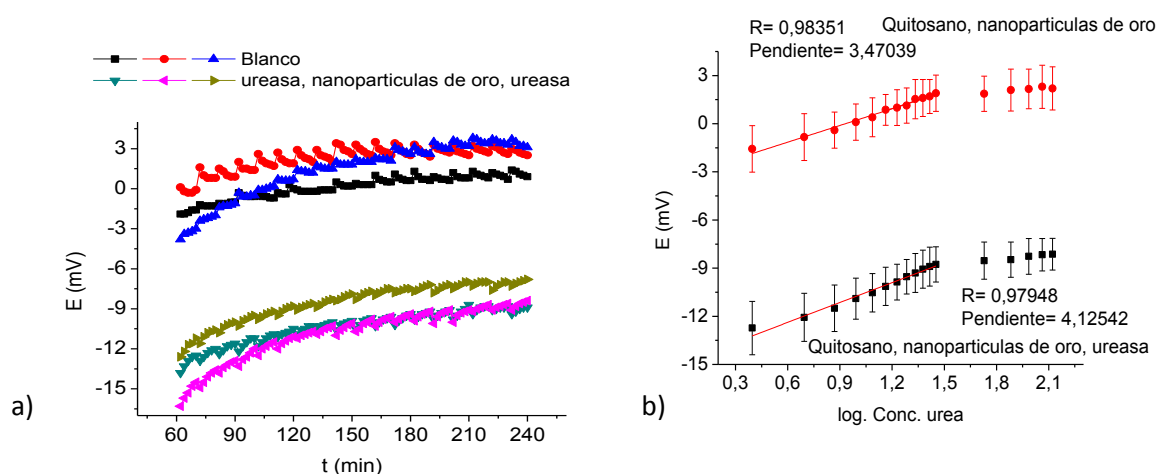
b)

**Figura 56.** a) Respuesta electroquímica voltamperométrica de la solución de hidroquinona sobre el electrodo modificado por el procedimiento II.9 (4). b) Microscopia óptica del electrodo de carbón vítreo modificado con quitosano y nanopartículas de oro antes (superior) y después (inferior) de realizar los experimentos voltamperométricos.

### V-3.1. Respuesta potenciométrica de la urea con el electrodo modificado con quitosano, nanopartículas de oro y ureasa comercial.

En la sección anterior se reportó que los métodos II.9 (2) y II.9 (4) utilizados para la modificación del electrodo de carbón vítreo, parecen ser los idóneos para realizar las medidas potenciométricas puesto que las películas formadas permanecían estables luego de realizado el experimento voltamperométrico, debido a esto se utilizaron ambos métodos para inmovilizar la enzima ureasa; este procedimiento se detalla en la sección II.9.1 de la parte experimental. En la figura 57 se muestra la respuesta potenciométrica de la solución de urea utilizando el electrodo de carbón vítreo modificado con quitosano, nanopartículas de oro y ureasa (método II.9.1 (a)), en la misma se puede observar un cambio en la respuesta del blanco y de la ureasa con las nanopartículas de oro, esto se atribuye a que las nanopartículas de oro tienen la capacidad de mejorar la señal ya que ayuda a que la hidrólisis de la urea se produzca a una velocidad mayor que cuando se tiene únicamente la enzima ureasa. En la parte b de la figura 57 se muestra la gráfica de E vs log. Conc. Urea pudiéndose apreciar un comportamiento lineal en un intervalo de concentración de 2,49 a

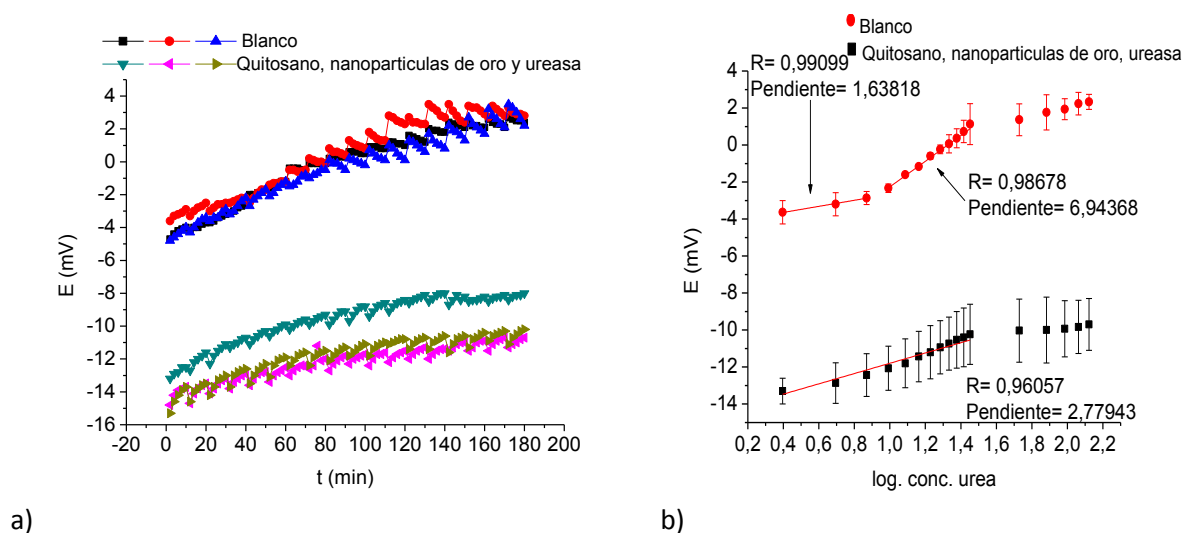
28,3 mM con una pendiente de 4,13 mV para las medidas con quitosano, nanopartículas de oro con la enzima ureasa incorporada y una pendiente de 3,47 mV para las medidas realizadas con electrodo modificado únicamente con quitosano y nanopartículas de oro. Al sobrepasar la concentración de 28,3 mM el biosensor se empieza a comportar de una manera estable mostrando de esta forma una saturación de los centros activos de la enzima.



**Figura 57.** (a) Respuesta potenciométrica de la urea utilizando el electrodo de carbón vítreo modificado con quitosano, nanopartículas de oro y ureasa y del blanco. (b) Gráfica de E vs log (conc.urea) de la urea utilizando el electrodo de carbón vítreo modificado con quitosano, nanopartículas de oro y ureasa y del blanco se reporta el valor promedio con su barra de error para  $n=3$

En la figura 58 se muestra la respuesta potenciométrica de la solución de urea, utilizando el electrodo de carbón vítreo modificado por el método II-9.1 (b) con la ureasa incorporada observándose un comportamiento semejante al obtenido con el método II.9.1 (b). Sin embargo, al graficar el E vs log.(conc. urea) (figura 58 (b)) se puede observar que presenta un comportamiento lineal con una pendiente de 2,78 mV para un rango de concentración de urea de 2,49 mM a 28,3 mM para las medidas potenciométricas utilizando el electrodo de carbón vítreo modificado con quitosano, nanopartículas de oro con la enzima incorporada y una pendiente de 1,64 mV para un rango de concentración de urea de 2,49 mM a 7,39 mM y una pendiente de 6,94 mV para un rango de concentración de urea de 9,8 mM a 28,3 mM para el caso del blanco, al comparar estas pendientes con las obtenidas con el método II.9.1 (a) se puede concluir que se obtienen mayores pendientes con este método, por esta razón se utilizó para continuar con las medidas potenciométricas

pero esta vez utilizando el extracto de la enzima ureasa provenientes de las semillas de soya germinadas.

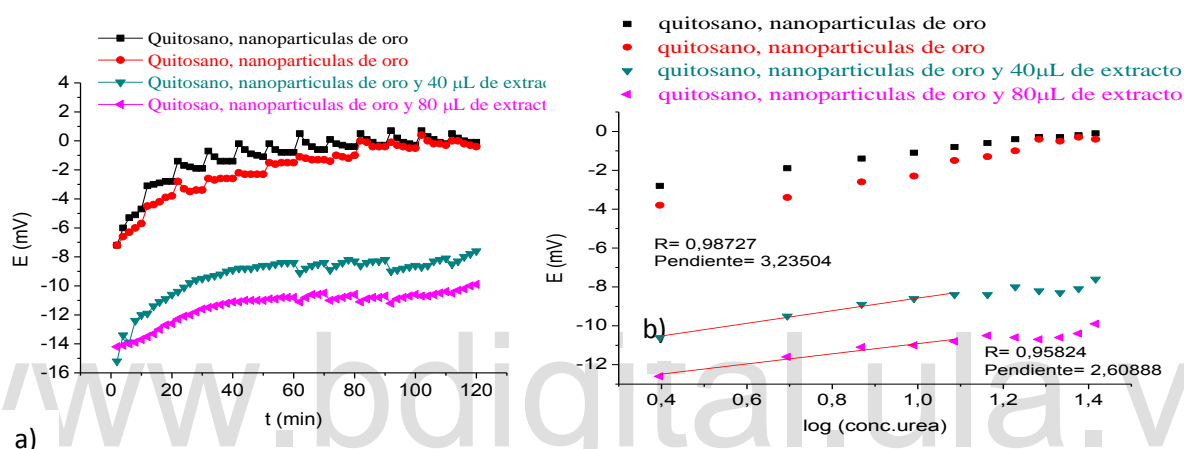


**Figura 58.** (a) Respuesta potenciométrica de la urea utilizando el electrodo de carbón vítreo modificado con quitosano, nanopartículas de oro y ureasa y del blanco. (b) Gráfica de E vs log.conc.urea de la urea utilizando el electrodo de carbón vítreo modificado con quitosano, nanopartículas de oro y ureasa y del blanco. Se reporta el valor promedio con su barra de error para  $n=3$

### V-3.2. Respuesta potenciométrica de la urea con el electrodo modificado con quitosano, nanopartículas de oro y extracto de ureasa.

En la figura 59 se muestra la respuesta potenciométrica de la solución de urea utilizando el electrodo de carbón vítreo modificado con quitosano, nanopartículas de oro y extracto de ureasa provenientes de las semillas de soya germinadas (sección experimental II-10), la cantidad de extracto que se inmovilizó en la superficie electródica se fue modificando de acuerdo a los resultados que se fueron obteniendo, primero se inmovilizó  $40 \mu\text{L}$  del extracto de ureasa en la película de quitosano y nanopartículas de oro, en este caso la respuesta es distinta a la obtenida por el blanco, y se observa un comportamiento lineal en un rango de concentración de urea de  $2,49 \text{ mM}$  a  $12,20 \text{ mM}$  y a partir de esta concentración las medidas potenciométricas se tornan estables, esto se atribuye a que los centros activos de la enzima se saturaron, además como el extracto no se purificó mediante una técnica de separación cromatográfica, el mismo se encontraba impuro con proteínas que se encuentran igualmente en las semillas de soya. por lo que es imposible garantizar

que en la superficie electródica se encuentren suficientes sitios activos provenientes de la enzima ureasa que ayuden a catalizar la hidrólisis de la urea, debido a que el rango de concentración de la urea es pequeño se procedió a inmovilizar el doble de volumen del extracto de ureasa, para probar si el rango dinámico lineal mejoraba, y como se puede observar en la figura 59 b, presentan el mismo rango de linealidad, con la diferencia de que la pendiente obtenida para la inmovilización de 40  $\mu\text{L}$  de extracto es mayor.



**Figura 59.** (a) Respuesta potenciométrica de la urea utilizando el electrodo de carbón vítreo modificado con quitosano, nanopartículas de oro y extracto de ureasa y del blanco. (b) Gráfica de  $E$  vs  $\log(\text{conc.urea})$  de la urea utilizando el electrodo de carbón vítreo modificado con quitosano, nanopartículas de oro y extracto de ureasa y del blanco

Se puede concluir que el biosensor potenciométrico arrojó resultados positivos ya que se observa una diferencia entre la medida del blanco y la medidas potenciométricas obtenidas con el electrodo modificado con la ureasa comercial, demostrando así que la ureasa cataliza la hidrólisis de la urea, también se puede concluir que la incorporación de las nanopartículas de oro son primordiales para mejorar las respuestas de los biosensores ya que se obtiene un mejor rango dinámico lineal que el obtenido con el biosensor potenciométrico ensamblado únicamente con el quitosano y con la ureasa comercial, sin embargo, a pesar de las excelente propiedades electrocatalíticas de estos nanomateriales no fueron suficiente para el caso del biosensor potenciométrico con el extracto de ureasa, ya que el rango lineal obtenido es bastante menor en comparación con el obtenido con la ureasa comercial, sin embargo estos resultados se consideran aceptables ya que algunos antecedentes mostrados en esta investigación obtuvieron un rango dinámico lineal de hasta 1mM.

W e

# Capítulo VI

## Conclusiones

y

## Recomendaciones



## Conclusiones

1. La enzima ureasa pudo ser extraída y posteriormente purificada parcialmente por diálisis a partir de las semillas de soya germinadas, lográndose cuantificar la actividad enzimática mediante el método de Kandeler y Gerber modificado por Kandeler, obteniendo un valor de 14,41 U/mL para el extracto de ureasa. Mientras que la ureasa comercial sólo mostró una actividad enzimática inferior (1,86 U/mL) a la reportada por el proveedor (5 U/mL), lo cual se atribuye a la mala conservación del material por parte del proveedor.
2. La activación cronoamperométrica de la superficie electródica en medio básico produjo una superficie uniforme y electroquímicamente activa para la inmovilización del sistema ureasa-quitosano.
3. Las películas de quitosano más estables (mecánica y voltamperométrica) son las obtenidas mediante electrodeposición a (-1,15 V y -1,3 V) en soluciones ácidas con la aplicación de un potencial catódico.
4. Los intentos por preparar un biosensor amperométrico fallaron principalmente debido a que el estudio voltamperométrico de la solución de urea empleando el electrodo modificado con el quitosano y la enzima ureasa incorporada no generó ninguna respuesta en corriente que pudiesen permitir el desarrollo del biosensor amperométrico.
5. Se logró preparar un biosensor potenciométrico para la detección de urea, encontrándose respuestas reproducibles utilizando el electrodo de carbón vítreo modificado con el quitosano depositado mediante una electrodeposición con la enzima ureasa. Este biosensor mostró dos segmentos de datos lineales, para el primer segmento se obtuvo una pendiente de 8,86 mV y para el segundo una pendiente de 6,54 mV.
6. La incorporación de nanopartículas de oro en el ensamblaje del biosensr potenciométrico permitió obtener mejores respuestas y un mayor rango dinámico lineal en la determinación de urea en solución.
7. Los rangos lineales de concentración para el biosensor potenciométrico en el cual se empleó el extracto de ureasa son menores a los correspondientes al biosensor empleando ureasa comercial, lo cual ha sido atribuido a lo complejo de la matriz y que la enzima no se encontraba lo suficientemente pura.

## Recomendaciones

1. Evaluar la incorporación de ureasa, proveniente de extractos de semillas de soya sometidos a procesos más profundos de purificación, para el desarrollo de biosensores potenciométricos.
2. Estudiar un nuevo protocolo para la inmovilización de la enzima ureasa, que mejoren la estabilidad en el tiempo del biosensor. Como por ejemplo, el uso de soportes de polímeros entrecruzados, que además eviten la lixiviación de la enzima ureasa.
3. Realizar estudios potenciométricos en muestras de suelos controlados.
4. Realizar estudios de diferentes superficies electrónicas (por ejemplo Au) que permitan el anclaje directo de la enzima ureasa, sin la necesidad del empleo de un soporte.

www.bdigital.ula.ve

## Anexo I-1.

1. Estudios electroquímicos de una solución 5mM de hidroquinona en diferentes soluciones buffer salino.

Tabla 5. Parámetros electroquímicos obtenidos de la respuesta voltamperométrica de la cupla hidroquinona/quinona a pH= 1 (HCl/KCl)

| Velocidad de barrido (mV/s) | I <sub>pa</sub> (A)   | I <sub>pc</sub> (A)    | E <sub>p/2</sub> Anódico (mV) | E <sub>p/2</sub> Catódico (mV) | I <sub>pa</sub> /I <sub>pc</sub> | ΔE <sub>p</sub> (mV) | E° (mV) |
|-----------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------|---------|
| 250                         | 5,03x10 <sup>-4</sup> | -4,12x10 <sup>-4</sup> | 0,441                         | 0,438                          | 1,22                             | 0,092                | 0,436   |
| 100                         | 3,17x10 <sup>-4</sup> | -2,76x10 <sup>-4</sup> | 0,440                         | 0,445                          | 1,15                             | 0,072                | 0,438   |
| 75                          | 2,80x10 <sup>-4</sup> | -2,39x10 <sup>-4</sup> | 0,442                         | 0,450                          | 1,17                             | 0,064                | 0,442   |
| 50                          | 2,26x10 <sup>-4</sup> | -1,97x10 <sup>-4</sup> | 0,442                         | 0,453                          | 1,15                             | 0,064                | 0,442   |
| 25                          | 1,59x10 <sup>-4</sup> | -1,44x10 <sup>-4</sup> | 0,440                         | 0,455                          | 1,10                             | 0,060                | 0,444   |
| 10                          | 1,01x10 <sup>-4</sup> | -9,36x10 <sup>-5</sup> | 0,440                         | 0,456                          | 1,08                             | 0,052                | 0,448   |

Tabla 6. Parámetros electroquímicos obtenidos de la respuesta voltamperométrica de la cupla hidroquinona/quinona a pH= 3 (Hidrogenofalato de potasio/HCl)

| Velocidad de barrido (mV/s) | I <sub>pa</sub> (A)   | I <sub>pc</sub> (A)    | E <sub>p/2</sub> Anódico (mV) | E <sub>p/2</sub> Catódico (mV) | I <sub>pa</sub> /I <sub>pc</sub> | ΔE <sub>p</sub> (mV) | E° (mV) |
|-----------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------|---------|
| 250                         | 3,66x10 <sup>-4</sup> | -3,52x10 <sup>-4</sup> | 0,386                         | 0,323                          | 1,04                             | 0,276                | 0,350   |
| 100                         | 2,57x10 <sup>-4</sup> | -2,47x10 <sup>-4</sup> | 0,371                         | 0,337                          | 1,04                             | 0,196                | 0,350   |
| 75                          | 2,30x10 <sup>-4</sup> | -2,20x10 <sup>-4</sup> | 0,371                         | 0,339                          | 1,05                             | 0,188                | 0,354   |
| 50                          | 1,94x10 <sup>-4</sup> | -1,89x10 <sup>-4</sup> | 0,363                         | 0,343                          | 1,03                             | 0,160                | 0,352   |
| 25                          | 1,48x10 <sup>-4</sup> | -1,40x10 <sup>-4</sup> | 0,355                         | 0,347                          | 1,06                             | 0,132                | 0,350   |
| 10                          | 1,00x10 <sup>-4</sup> | -9,76x10 <sup>-5</sup> | 0,347                         | 0,352                          | 1,02                             | 0,104                | 0,348   |

**Tabla 7.** Parámetros electroquímicos obtenidos de la respuesta voltamperométrica de la cupla hidroquinona/quinona a pH= 5,8 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH)

| Velocidad de barrido (mV/s) | I <sub>pa</sub> (A)   | I <sub>pc</sub> (A)     | E <sub>p/2</sub> Anódico (mV) | E <sub>p/2</sub> Catódico (mV) | I <sub>pa</sub> /I <sub>pc</sub> | ΔE <sub>p</sub> (mV) | E° (mV) |
|-----------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------|---------|
| 250                         | 3,04x10 <sup>-4</sup> | -3,34x10 <sup>-4</sup>  | 0,242                         | 0,236                          | 0,91                             | 0,342                | 0,241   |
| 100                         | 2,06x10 <sup>-4</sup> | -2,27x10 <sup>-4</sup>  | 0,220                         | 0,235                          | 0,91                             | 0,272                | 0,240   |
| 75                          | 1,84x10 <sup>-4</sup> | -1,998x10 <sup>-4</sup> | 0,215                         | 0,241                          | 0,92                             | 0,260                | 0,244   |
| 50                          | 1,52x10 <sup>-4</sup> | -1,66x10 <sup>-4</sup>  | 0,210                         | 0,237                          | 0,92                             | 0,248                | 0,242   |
| 25                          | 1,14x10 <sup>-4</sup> | -1,24x10 <sup>-4</sup>  | 0,203                         | 0,240                          | 0,92                             | 0,216                | 0,244   |
| 10                          | 7,29x10 <sup>-5</sup> | -8,18x10 <sup>-5</sup>  | 0,199                         | 0,229                          | 0,89                             | 0,198                | 0,245   |

**Tabla 8.** Parámetros electroquímicos obtenidos de la respuesta voltamperométrica de la cupla hidroquinona/quinona a pH= 6,8 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH)

| Velocidad de barrido (mV/s) | I <sub>pa</sub> (A)   | I <sub>pc</sub> (A)    | E <sub>p/2</sub> Anódico (mV) | E <sub>p/2</sub> Catódico (mV) | I <sub>pa</sub> /I <sub>pc</sub> | ΔE <sub>p</sub> (mV) | E° (mV) |
|-----------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------|---------|
| 250                         | 3,46x10 <sup>-4</sup> | -3,28x10 <sup>-4</sup> | 0,194                         | 0,114                          | 1,05                             | 0,284                | 0,150   |
| 100                         | 2,46x10 <sup>-4</sup> | -2,09x10 <sup>-4</sup> | 0,171                         | 0,133                          | 1,18                             | 0,212                | 0,150   |
| 75                          | 2,24x10 <sup>-4</sup> | -1,92x10 <sup>-4</sup> | 0,167                         | 0,135                          | 1,17                             | 0,204                | 0,150   |
| 50                          | 1,88x10 <sup>-4</sup> | -1,57x10 <sup>-4</sup> | 0,160                         | 0,140                          | 1,20                             | 0,176                | 0,148   |
| 25                          | 1,40x10 <sup>-4</sup> | -1,15x10 <sup>-4</sup> | 0,153                         | 0,145                          | 1,22                             | 0,144                | 0,148   |
| 10                          | 9,38x10 <sup>-5</sup> | -7,44x10 <sup>-5</sup> | 0,145                         | 0,150                          | 1,26                             | 0,104                | 0,152   |

Tabla 9. Parámetros electroquímicos obtenidos de la respuesta voltamperométrica de la cupla hidroquinona/quinona a pH= 7,2 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH)

| Velocidad de barrido (mV/s) | I <sub>pa</sub> (A)   | I <sub>pc</sub> (A)    | E <sub>p/2</sub> Anódico (mV) | E <sub>p/2</sub> Catódico (mV) | I <sub>pa</sub> /I <sub>pc</sub> | ΔE <sub>p</sub> (mV) | E° (mV) |
|-----------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------|---------|
| 250                         | 3,55x10 <sup>-4</sup> | -3,61x10 <sup>-4</sup> | 0,154                         | 0,079                          | 0,98                             | 0,292                | 0,114   |
| 100                         | 2,52x10 <sup>-4</sup> | -2,59x10 <sup>-4</sup> | 0,135                         | 0,092                          | 0,97                             | 0,234                | 0,113   |
| 75                          | 2,32x10 <sup>-4</sup> | -2,36x10 <sup>-4</sup> | 0,132                         | 0,097                          | 0,98                             | 0,204                | 0,114   |
| 50                          | 1,97x10 <sup>-4</sup> | -1,95x10 <sup>-4</sup> | 0,125                         | 0,103                          | 1,01                             | 0,184                | 0,112   |
| 25                          | 1,47x10 <sup>-4</sup> | -1,45x10 <sup>-4</sup> | 0,117                         | 0,110                          | 1,01                             | 0,148                | 0,114   |
| 10                          | 9,74x10 <sup>-5</sup> | -9,81x10 <sup>-5</sup> | 0,111                         | 0,117                          | 0,99                             | 0,120                | 0,112   |

Tabla 10. Parámetros electroquímicos obtenidos de la respuesta voltamperométrica de la cupla hidroquinona/quinona a pH= 7,4 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH)

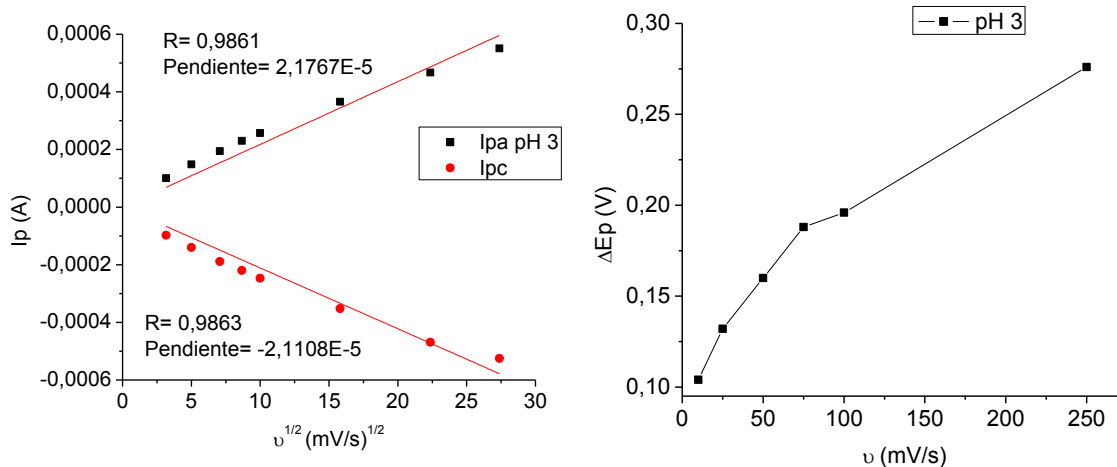
| Velocidad de barrido (mV/s) | I <sub>pa</sub> (A)   | I <sub>pc</sub> (A)    | E <sub>p/2</sub> Anódico (mV) | E <sub>p/2</sub> Catódico (mV) | I <sub>pa</sub> /I <sub>pc</sub> | ΔE <sub>p</sub> (mV) | E° (mV) |
|-----------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------|---------|
| 250                         | 2,53x10 <sup>-4</sup> | -2,12x10 <sup>-4</sup> | 0,154                         | 0,072                          | 1.18                             | 0,268                | 0,120   |
| 100                         | 1,71x10 <sup>-4</sup> | -1,46x10 <sup>-4</sup> | 0,132                         | 0,093                          | 1.37                             | 0,204                | 0,116   |
| 75                          | 1,50x10 <sup>-4</sup> | -1,31x10 <sup>-4</sup> | 0,127                         | 0,099                          | 1.02                             | 0,184                | 0,114   |
| 50                          | 1,26x10 <sup>-4</sup> | -1,10x10 <sup>-4</sup> | 0,118                         | 0,101                          | 1,04                             | 0,168                | 0,114   |
| 25                          | 9,31x10 <sup>-5</sup> | -8,10x10 <sup>-5</sup> | 0,113                         | 0,108                          | 0.99                             | 0,136                | 0,110   |
| 10                          | 6,23x10 <sup>-5</sup> | -5,28x10 <sup>-5</sup> | 0,106                         | 0,111                          | 1.00                             | 0,108                | 0,108   |

Tabla 11. Parámetros electroquímicos obtenidos de la respuesta voltamperométrica de la cupla hidroquinona/quinona a pH= 8 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH)

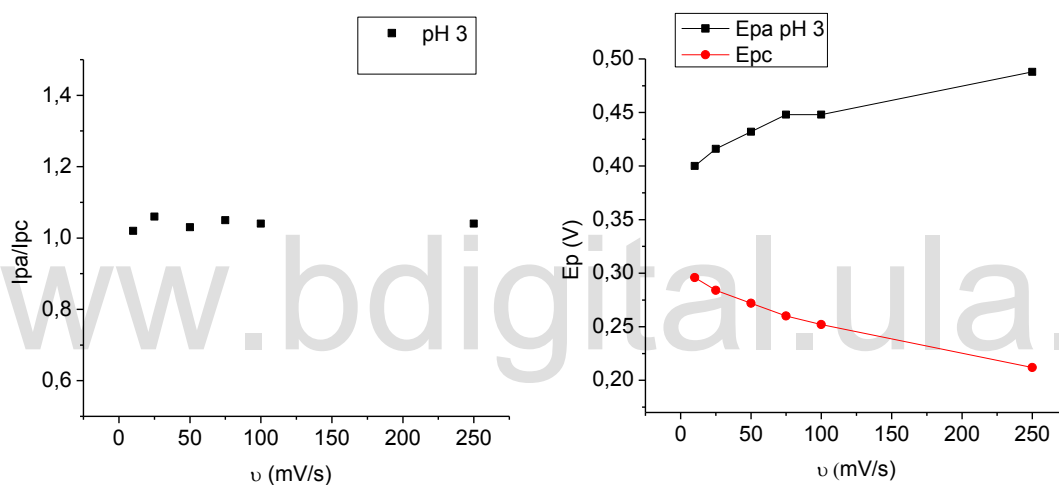
| Velocidad de barrido (mV/s) | I <sub>pa</sub> (A)   | I <sub>pc</sub> (A)    | I <sub>pa</sub> /I <sub>pc</sub> | ΔE <sub>p</sub> (mV) | E° (mV) |
|-----------------------------|-----------------------|------------------------|----------------------------------|----------------------|---------|
| 250                         | 2,46x10 <sup>-4</sup> | -1,90x10 <sup>-4</sup> | 1,77                             | 0,170                | 0,144   |
| 100                         | 1,49x10 <sup>-4</sup> | -1,28x10 <sup>-4</sup> | 1,20                             | 0,228                | 0,079   |
| 75                          | 1,31x10 <sup>-4</sup> | -1,12x10 <sup>-4</sup> | 1,18                             | 0,204                | 0,079   |
| 50                          | 1,09x10 <sup>-4</sup> | -9,13x10 <sup>-5</sup> | 1,13                             | 0,188                | 0,079   |
| 25                          | 7,92x10 <sup>-5</sup> | -6,43x10 <sup>-5</sup> | 1,11                             | 0,160                | 0,077   |
| 10                          | 5,27x10 <sup>-5</sup> | -4,03x10 <sup>-5</sup> | 1,83                             | 0,128                | 0,077   |

Tabla 12. Parámetros electroquímicos obtenidos de la respuesta voltamperométrica de la cupla hidroquinona/quinona a pH= 12 (KCl/NaOH)

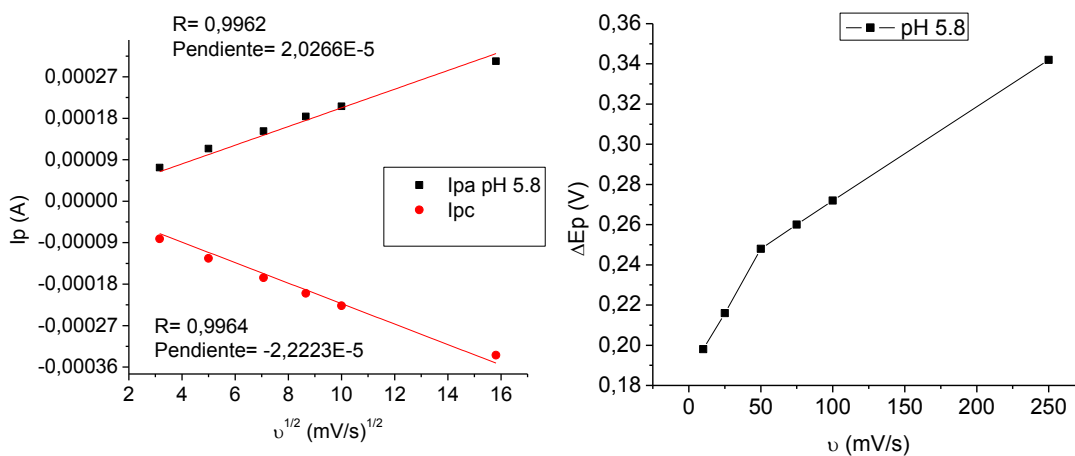
| Velocidad de barrido (mV/s) | I <sub>pa</sub> (A)   | I <sub>pc</sub> (A)    | I <sub>pa</sub> /I <sub>pc</sub> | ΔE <sub>p</sub> (mV) | E° (mV) |
|-----------------------------|-----------------------|------------------------|----------------------------------|----------------------|---------|
| 250                         | 9,23x10 <sup>-5</sup> | -5,95x10 <sup>-5</sup> | 0,99                             | 0,236                | 0,054   |
| 100                         | 5,96x10 <sup>-5</sup> | -3,45x10 <sup>-5</sup> | 1,12                             | 0,108                | -0,118  |
| 75                          | 5,14x10 <sup>-5</sup> | -2,90x10 <sup>-5</sup> | 1,09                             | 0,096                | -0,116  |
| 50                          | 4,18x10 <sup>-5</sup> | -2,21x10 <sup>-5</sup> | 1,13                             | 0,116                | -0,114  |
| 25                          | 3,1x10 <sup>-5</sup>  | -1,30x10 <sup>-5</sup> | 1,17                             | 0,112                | -0,120  |
| 10                          | 2,34x10 <sup>-5</sup> | -6,10x10 <sup>-6</sup> | 1,26                             | 0,124                | -0,126  |



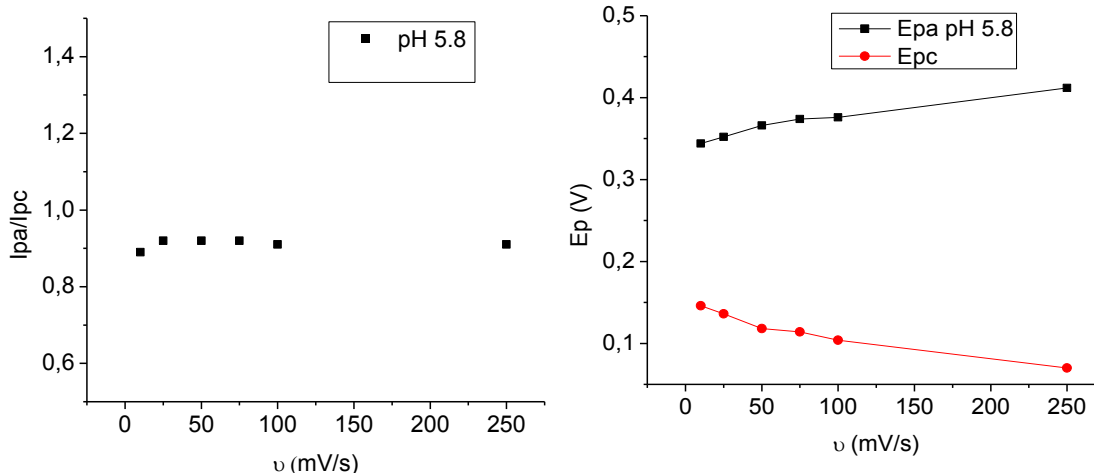
**Figura 60.** (a) Respuesta de  $I_p$  vs  $v^{1/2}$  pH 3 (b) Respuesta de  $\Delta E_p$  vs  $v$  pH 3, ambos necesarios para evaluar la reversibilidad del sistema



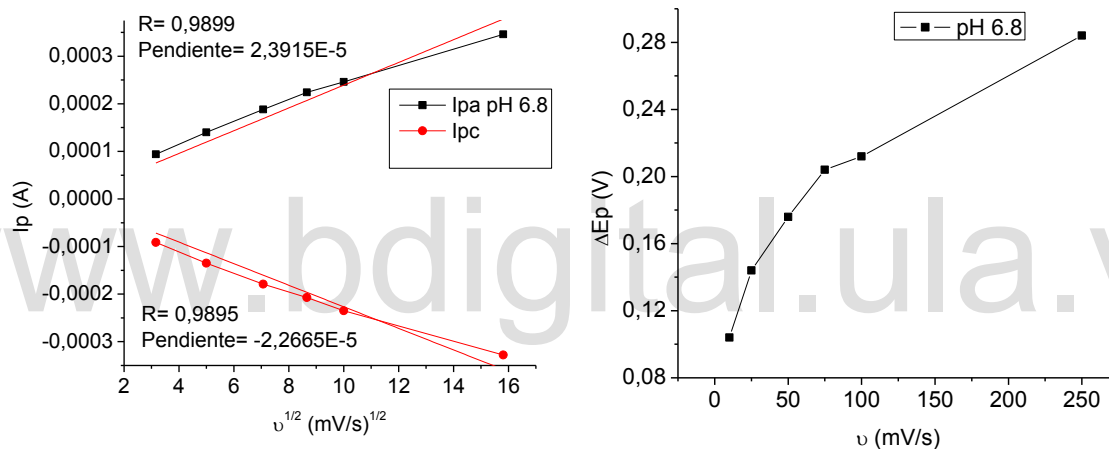
**Figura 61.** (a) Respuesta de  $I_{pa}/I_{pc}$  vs  $v$  pH 3 (b) Respuesta de  $E_p$  vs  $v$  pH 3, ambos necesarios para evaluar la reversibilidad del sistema



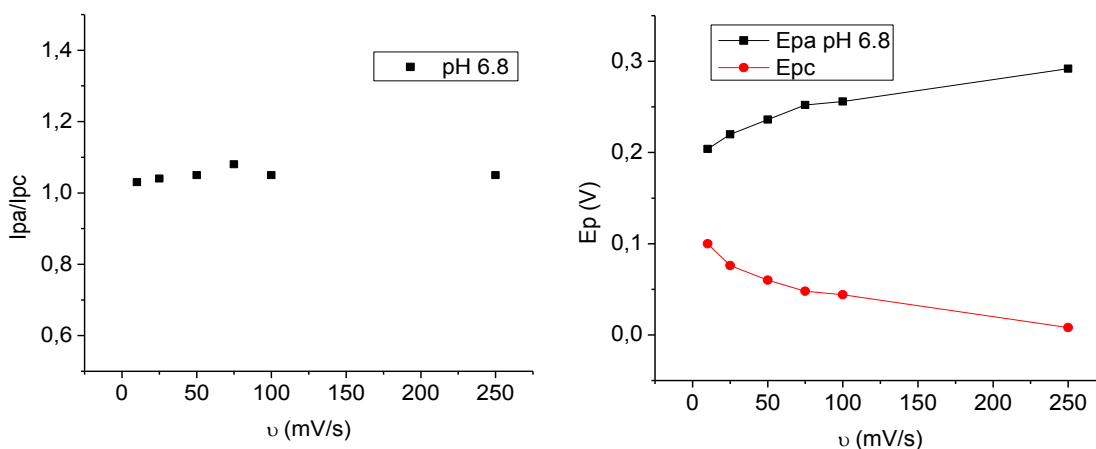
**Figura 62.** (a) Respuesta de  $I_p$  vs  $v^{1/2}$  pH 5,8 (b) Respuesta de  $\Delta E_p$  vs  $v$  pH 5,8, ambos necesarios para evaluar la reversibilidad del sistema



**Figura 63.** (a) Respuesta de  $I_{pa}/I_{pc}$  vs  $v$  pH 5,8 (b) Respuesta de  $E_p$  vs  $v$  pH 5,8, ambos necesarios para evaluar la reversibilidad del sistema

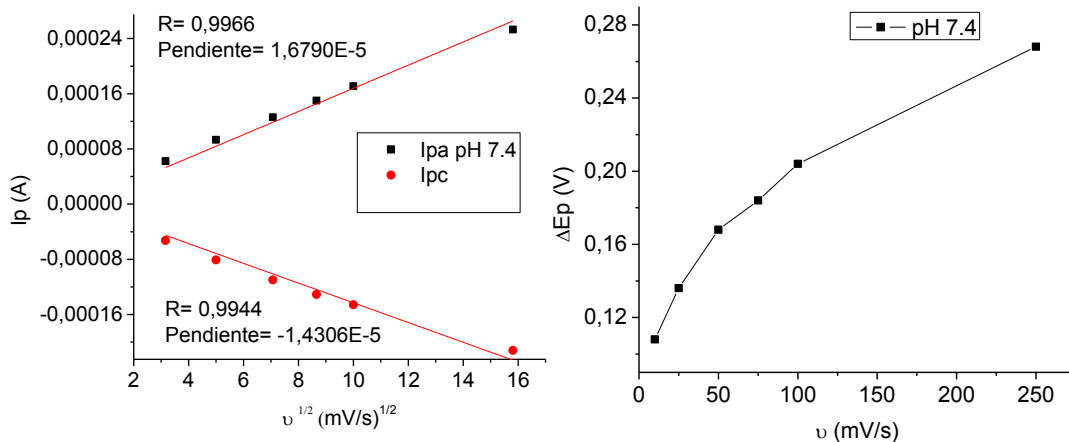


**Figura 64.** (a) Respuesta de  $I_p$  vs  $v^{1/2}$  pH 6,8 (b) Respuesta de  $\Delta E_p$  vs  $v$  pH 6,8, ambos necesarios para evaluar la reversibilidad del sistema

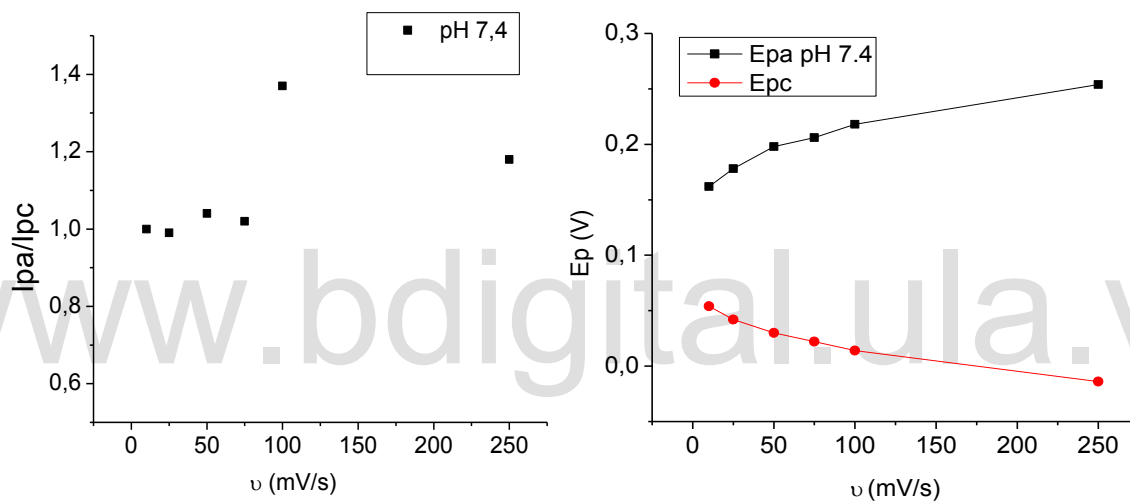


**Figura 65.** (a) Respuesta de  $I_{pa}/I_{pc}$  vs  $v$  pH 6,8 (b) Respuesta de  $E_p$  vs  $v$  pH 6,8, ambos necesarios para evaluar la reversibilidad del sistema

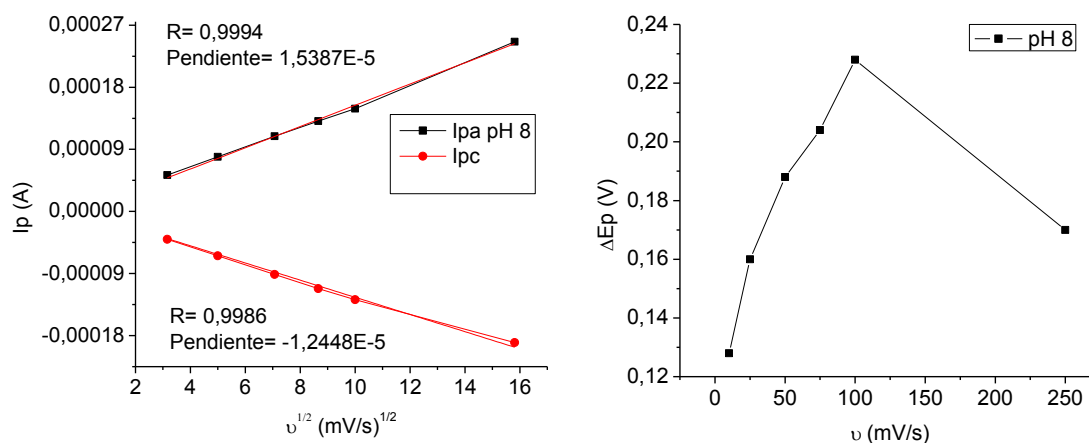




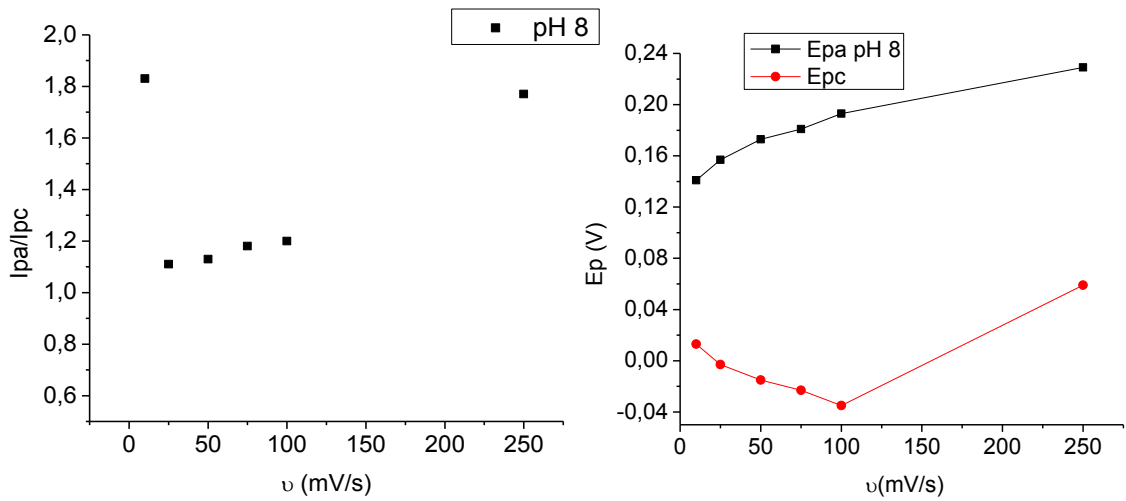
**Figura 66.** (a) Respuesta de  $I_p$  vs  $v^{1/2}$  pH 7,4 (b) Respuesta de  $\Delta E_p$  vs  $v$  pH 7,4, ambos necesarios para evaluar la reversibilidad del sistema



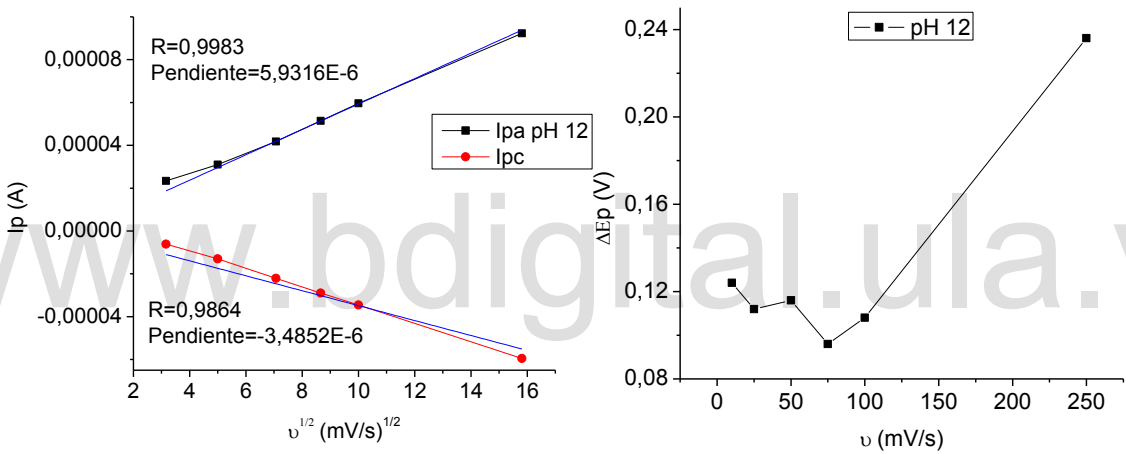
**Figura 67.** (a) Respuesta de  $I_{pa}/I_{pc}$  vs  $v$  pH 7,4 (b) Respuesta de  $E_p$  vs  $v$  pH 7,4, ambos necesarios para evaluar la reversibilidad del sistema



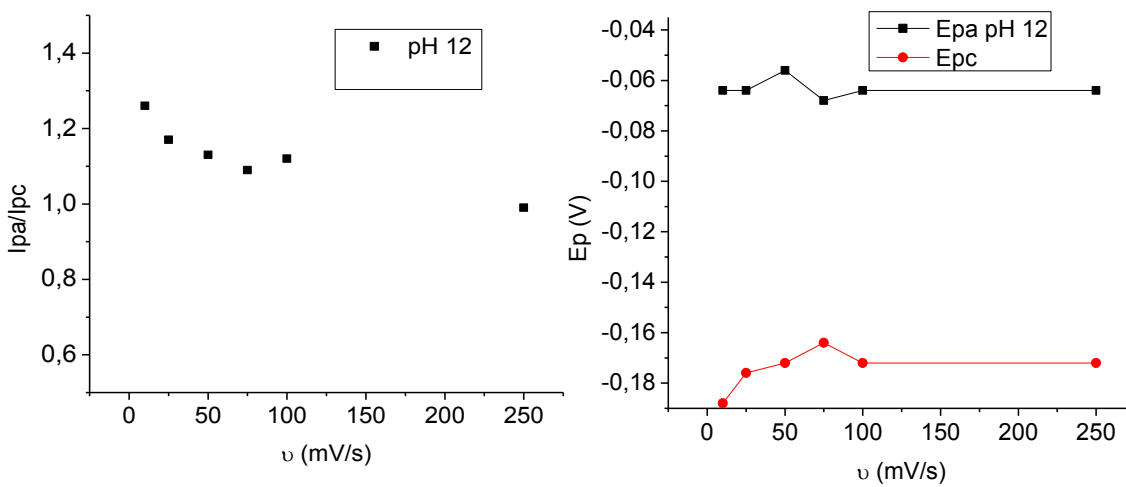
**Figura 68.** (a) Respuesta de  $I_p$  vs  $v^{1/2}$  pH 8 (b) Respuesta de  $\Delta E_p$  vs  $v$  pH 8, ambos necesarios para evaluar la reversibilidad del sistema



**Figura 69.** (a) Respuesta de  $I_{pa}/I_{pc}$  vs  $v$  pH 8 (b) Respuesta de  $E_p$  vs  $v$  pH 8, ambos necesarios para evaluar la reversibilidad del sistema



**Figura 70.** (a) Respuesta de  $I_p$  vs  $v^{1/2}$  pH 12 (b) Respuesta de  $\Delta E_p$  vs  $v$  pH 12, ambos necesarios para evaluar la reversibilidad del sistema

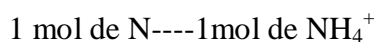


**Figura 71.** (a) Respuesta de  $I_{pa}/I_{pc}$  vs  $v$  pH 12 (b) Respuesta de  $E_p$  vs  $v$  pH 12, ambos necesarios para evaluar la reversibilidad del sistema

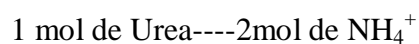
## Anexo I-2.

Ejemplo del cálculo de la actividad enzimática de la ureasa comercial

$$25.453 \frac{\text{mg N}}{1L \text{ de sol}} \times \frac{1 \text{ mol N}}{14 \text{ g}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times 10^{-3} L = 1,79 \times 10^{-5} \text{ mol N}$$



$$1,79 \times 10^{-5} \text{ de N} \text{-----} x = 1,79 \times 10^{-5} \text{ mol de NH}_4^+$$



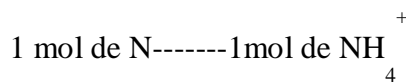
$$8,95 \times 10^{-6} \text{ mol de urea} = \text{-----} 1,79 \times 10^{-5} \text{ mol de NH}_4^+$$

$$8,95 \times 10^{-6} \text{ mol de urea} = 8,95 \mu\text{mol de urea}$$

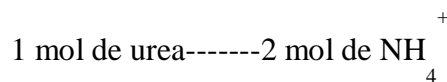
$$\text{Actividad enzimática} = \frac{8,95 \mu\text{mol de urea}}{0,04 \text{ mL de ureasa} \times 120 \text{ min}} = 1,86 \text{ U/mL}$$

Ejemplo del cálculo de la actividad enzimática del extracto de ureasa

$$193.59 \frac{\text{mg N}}{1L \text{ de sol}} \times \frac{1 \text{ mol N}}{14 \text{ g}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times 10^{-3} L = 1,38 \times 10^{-4} \text{ mol N}$$



$$1,38 \times 10^{-4} \text{ mol de N} \text{-----} = 1,38 \times 10^{-4} \text{ de NH}_4^+$$



$$6,91 \times 10^{-5} \text{ mol del urea} = \text{-----} 1,38 \times 10^{-4} \text{ mol de NH}_4^+$$

$$6,91 \times 10^{-5} \text{ mol de urea} = 69,1 \mu\text{mol de urea}$$

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{69,1 \mu\text{mol de urea}}{0,04 \text{ mL de ureasa} \times 120 \text{ min}} = 14,41 \text{ U/mL}$$

### Anexo I-3.

**Tabla 13.** Medidas de absorbancia en función de la concentración de nitrógeno amoniacal obtenidas a 670 nm adaptado de la referencia <sup>(57)</sup>. (curva de calibración sencilla).

| Concentración<br>mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L<br>(ppm) | Absorbancia |        |        | Media  | Desviación<br>estándar | Desviación<br>estándar<br>relativa<br>porcentual |
|----------------------------------------------------------------|-------------|--------|--------|--------|------------------------|--------------------------------------------------|
|                                                                |             |        |        |        |                        |                                                  |
| 0,6                                                            | 0,0151      | 0,0219 | 0,0228 | 0,0199 | 0,0042                 | 21,1199                                          |
| 0,9                                                            | 0,0271      | 0,0445 | 0,0444 | 0,0387 | 0,0100                 | 25,9064                                          |
| 1,0                                                            | 0,0302      | 0,0431 | 0,0393 | 0,0375 | 0,0066                 | 17,6616                                          |
| 1,2                                                            | 0,0357      | 0,0543 | 0,0503 | 0,0468 | 0,0098                 | 20,9347                                          |
| 1,5                                                            | 0,0510      | 0,0707 | 0,0696 | 0,0638 | 0,0111                 | 17,3601                                          |
| 1,8                                                            | 0,0632      | 0,0772 | 0,0740 | 0,0715 | 0,0073                 | 10,2646                                          |
| 2,0                                                            | 0,0789      | 0,1031 | 0,1002 | 0,0941 | 0,0132                 | 14,0480                                          |
| 2,4                                                            | 0,1038      | 0,1096 | 0,1075 | 0,1070 | 0,0029                 | 2,7453                                           |
| 2,7                                                            | 0,1190      | 0,1199 | 0,1170 | 0,1186 | 0,0015                 | 1,2512                                           |
|                                                                |             |        |        |        |                        | Promedio                                         |
|                                                                |             |        |        |        |                        | 14,59                                            |

**Tabla 14.** Parámetros estadísticos de la curva de calibración sencilla (determinación de la actividad de la ureasa comercial).

|                                                                |                                                                                                                                |         |
|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Número de datos                                                | <b>n</b>                                                                                                                       | 9       |
| Pendiente                                                      | <b>b</b>                                                                                                                       | 0,0503  |
| Corte con eje Y                                                | <b>a</b>                                                                                                                       | -0,0205 |
| Coefficiente de determinación                                  | <b>r<sup>2</sup></b>                                                                                                           | 0,9863  |
| Coefficiente de correlación                                    | <b>r</b>                                                                                                                       | 0,9931  |
| Desviación estándar de la pendiente                            | <b>S<sub>b</sub></b>                                                                                                           | 0,0022  |
| Desviación estándar del corte con eje Y                        | <b>S<sub>a</sub></b>                                                                                                           | 0,0038  |
| Error típico de la regresión                                   | <b>S<sub>y</sub>, S<sub>x/y</sub>, S<sub>x,y</sub>, o S<sub>e</sub></b>                                                        | 0,0045  |
| Error típico de la regresión al cuadrado                       | <b>(S<sub>y</sub>)<sup>2</sup>, (S<sub>x/y</sub>)<sup>2</sup>, (S<sub>x,y</sub>)<sup>2</sup> o (S<sub>e</sub>)<sup>2</sup></b> | 0,00002 |
| Sumatoria de los (X <sub>i</sub> -X <sub>m</sub> ) al cuadrado | <b>S<sub>xx</sub>=Σ(xi-xm)<sup>2</sup></b>                                                                                     | 4,0600  |
| Sumatoria de los (y <sub>i</sub> -y <sub>m</sub> ) al cuadrado | <b>S<sub>yy</sub>=Σ(yi-ym)<sup>2</sup></b>                                                                                     | 0,0104  |
| Coefficiente de variación de la regresión (precisión)          | <b>CV</b>                                                                                                                      | 7,7485  |
| Límite de detección en función S <sub>a</sub>                  | <b>LOD1 (3S<sub>a</sub>/b)</b>                                                                                                 | 0,2278  |
| Límite de cuantificación en función S <sub>a</sub>             | <b>LOQ1 (10S<sub>a</sub>/b)</b>                                                                                                | 0,7594  |
| Límite de detección en función error típico                    | <b>LOD2 (3S<sub>x,y</sub>/b)</b>                                                                                               | 0,2693  |
| Límite de cuantificación en función error típico               | <b>LOQ2 (10S<sub>x,y</sub>/b)</b>                                                                                              | 0,8977  |

**Tabla 15.** Medidas de absorbancia en función de la concentración de nitrógeno amoniacal obtenidas a 659,28 nm adaptado de la referencia<sup>(57)</sup>.

| Concentración<br>mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L<br>(ppm) | Absorbancia |        |        | Media  | Desviación<br>estandar | Desviación<br>estándar<br>relativa<br>porcentual |
|----------------------------------------------------------------|-------------|--------|--------|--------|------------------------|--------------------------------------------------|
|                                                                |             |        |        |        |                        |                                                  |
| 0                                                              | 0,0100      | 0,0030 | 0,0354 | 0,0161 | 0,0171                 | 105,6729                                         |
| 0,4                                                            | 0,0280      | 0,0240 | 0,0538 | 0,0353 | 0,0162                 | 45,8633                                          |
| 0,6                                                            | 0,0397      | 0,0360 | 0,0609 | 0,0455 | 0,0134                 | 29,5078                                          |
| 0,9                                                            | 0,0547      | 0,0569 | 0,0806 | 0,0641 | 0,0144                 | 22,4149                                          |
| 1,2                                                            | 0,0738      | 0,0723 | 0,0944 | 0,0802 | 0,0124                 | 15,4044                                          |
| 1,4                                                            | 0,0955      | 0,0819 | 0,1082 | 0,0952 | 0,0132                 | 13,8157                                          |
| 1,8                                                            | 0,1111      | 0,0984 | 0,1301 | 0,1132 | 0,0160                 | 14,0936                                          |
| 2,1                                                            | 0,1259      | 0,1210 | 0,1501 | 0,1323 | 0,0156                 | 11,7735                                          |
|                                                                |             |        |        |        |                        | Promedio                                         |
|                                                                |             |        |        |        |                        | 32,32                                            |

**Tabla 16.** Parámetros estadísticos de la curva de calibración estándar (determinación de la actividad del extracto de ureasa proveniente de las semillas de soya germinadas).

|                                                                |                                                                                                                                    |         |
|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Número de datos                                                | <b>n</b>                                                                                                                           | 8       |
| Pendiente                                                      | <b>b</b>                                                                                                                           | 0,0577  |
| Corte con eje Y                                                | <b>a</b>                                                                                                                           | 0,0068  |
| Coefficiente de determinación                                  | <b>r<sup>2</sup></b>                                                                                                               | 0,9912  |
| Coefficiente de correlación                                    | <b>r</b>                                                                                                                           | 0,9956  |
| Desviación estándar de la pendiente                            | <b>S<sub>b</sub></b>                                                                                                               | 0,0022  |
| Desviación estándar del corte con eje Y                        | <b>S<sub>a</sub></b>                                                                                                               | 0,0028  |
| Error típico de la regresión                                   | <b>S<sub>y</sub>, S<sub>x/y</sub>, S<sub>x,y</sub>, o S<sub>e</sub></b>                                                            | 0,0042  |
| Error típico de la regresión al cuadrado                       | <b>(S<sub>y</sub>)<sup>2</sup>, (S<sub>x/y</sub>)<sup>2</sup>, (S<sub>x,y</sub>)<sup>2</sup><br/>o (S<sub>e</sub>)<sup>2</sup></b> | 0,00001 |
| Sumatoria de los (X <sub>i</sub> -X <sub>m</sub> ) al cuadrado | <b>S<sub>xx</sub>=Σ(xi-xm)<sup>2</sup></b>                                                                                         | 3,5600  |
| Sumatoria de los (y <sub>i</sub> -y <sub>m</sub> ) al cuadrado | <b>S<sub>yy</sub>=Σ(yi-ym)<sup>2</sup></b>                                                                                         | 0,0120  |
| Coefficiente de variación de la regresión (precisión)          | <b>CV</b>                                                                                                                          | 6,2175  |
| Límite de detección en función S <sub>a</sub>                  | <b>LOD1 (3S<sub>a</sub>/b)</b>                                                                                                     | 0,1436  |
| Límite de cuantificación en función S <sub>a</sub>             | <b>LOQ1 (10S<sub>a</sub>/b)</b>                                                                                                    | 0,4788  |
| Límite de detección en función error típico                    | <b>LOD2 (3S<sub>x,y</sub>/b)</b>                                                                                                   | 0,2179  |
| Límite de cuantificación en función error típico               | <b>LOQ2 (10S<sub>x,y</sub>/b)</b>                                                                                                  | 0,7262  |

## Bibliografía

1. **C. Rondon.** [Ajuste y validación de un procedimiento fotométrico para la determinación de la actividad enzimática ureasa en suelos]. tesis de licenciatura / Universidad de los Andes, 2007.
2. **S. Navarro y G. Navarro.** [El suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal] [Informe]. Mundi-Prensa, 2003.
3. **H. Curtis, A. Schnek.** Curtis Biología. Madrid : Médica Panamericana S.A, 7ma edición. pág 875-880. 2008.
4. **J. Deckers, O. Spaargaren, F. Nachtergaele, L. Oldeman, R. Brinkman.** [Base referencial mundial del recurso suelo]. Food & Agriculture Org., Vol. 84. pág 7-9. 1999.
5. **M. Astier-Calderón M. Maass-Moreno y J. Etchevers-Barra.** [Derivación de indicadores de calidad de suelos en el contexto de la agricultura sustentable]. Agrociencia...- Vol. 36. - págs. 33-59. 2002.
6. **J. Ferreira.** [Propiedades bioquímicas de suelos de prados de Galicia]. Tesis de licenciatura. Universidad de Santiago de Compostela. - págs. 21-28. 2007.
7. **J. Jaramillo.** [Introducción a la ciencia del suelo]. Universidad Nacional de Colombia, págs 48-64. Medellín-Colombia. 2002..
8. **Valencia., C.** [Bioquímica de suelos]. Universidad Nacional Autónoma de México. págs 20-28. <http://www.agricolaunam.mx/edafologia/BIOQUIMICA%20DE%20SUELOS/bioquimica%20de%20suelos%202009>. (05/03/2015).
9. **Y. Vergara.** [Evaluación del efecto de la gallinaza sobre la actividad biológica de un suelo del municipio pueblo llano] Tesis de licenciatura. Universidad de los Andes, Mérida. 2013.
10. **M. en C. O. Grajales.** [Apuntes de bioquímica vegetal; Bases para su aplicación fisiológica] 1era edición. Universidad Nacional Autónoma de México, págs 42-45. 2005.
11. **M. E. Guntiñas. R.** [Influencia de la temperatura y de la humedad en la dinámica de la materia orgánica de los suelos de Galicia y su relación con el cambio climático] Tesis de doctorado. Universidad de Santiago de Compostela-España. págs. 110-111. 2009.
12. **J. Koolman y K. H. Rohm.** [Bioquímica; Texto y Atlas] 3ª Edición, Médica Panamericana, págs. 88-95. 2004.

13. **C. Henríquez L. Uribe, A. Valenciano, R. Nogales**, [Actividad enzimática del suelo- Deshidrogenasa, B-Glucosidasa, fosfatasa y ureasa- bajo diferentes cultivos]. *Agronomía Costarricense*. Vol. 38, 1. págs. 43-54. 2014.
14. **E. S. Méndez G.C. Flores y E.A. Cervantes**. [Hidrólisis de N-Orgánico y Liberación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> Mediante Actividad Ureasa en Suelos Forestales de Áreas Naturales Protegidas] UNAM.  
file:///C:/Users/usuario/Downloads/Actividad\_Ureasa\_en\_suelos\_%20Forestales\_de\_%20ANPs%20(2).pdf (27/11/15).
15. **E.A. Paul J.N. Ladd** [Soil Biochemistry]. Marcel Dekker, Vol. 5. págs. 160-163. 1981.
16. **L.N. Overrein**. [The chemistry of ureanitrogen transformations in soil]. Doctoral thesis. Purdue University. West Lafayette-U.S. 1963.
17. **V.V. Rachinskiy and A.S. Pel'tser**. [The kinetics of urea decomposition in soil] *Dokl. TSKhA*, Vol. 109. págs 75-78. 1965.
18. **D. M. H. Simpson and S. W. Melsted**. [Urea hydrolysis and transformation in some illinois soils]. *Soil Sci. Soc. Amer, Proc.* Vol. 27. págs. 48-50. 1963.
19. **C. H. Wang Y. I. Tseng and Y. S. Puh**. [A study on the behavior of urea in Taiwan soils]. *Soils Fert. Taiwan*, Vol. 12. págs. 14-25. 1966.
20. **N. Pettit, A. Smith, R. Freedman and R. Burns**. [Soil Urease: Activity, stability and kinetic properties] *Soil. Biol. Biochem.* Vol. 8. págs. 479-484. 1976.
21. **M.A. Tabatai and J.M Bremner**. [Assay of urease activity in soils]. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 4. págs. 479-487. 1972.
22. **L.D. Sandoval** [Ajuste y validación de la determinación fotométrica de la actividad deshidrogenasa en suelos]. Tesis de licenciatura. Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela. 2009.
23. **D. Voet and J. G. Voet**. [Bioquímica]. 3era edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. págs 473-475. 2006.
24. **J. Teijón, A. Garrido, D. Blanco, C. Villaverde, C. Mendoza y J. Ramírez**. [Fundamentos de Bioquímica Metabólica] 2da edición. Editorial Tébar. Madrid- España. págs 196-198. 2006.
25. **J. Harrison**. [El ciclo del nitrógeno\_ De microbios y de hombres]. Visionlearning, Vol. 2, 4. 2003.

26. **S. J. Ferguson.** [Nitrogen cycle enzymology] *Current Biology*. Vol. 2. Vol. 2. - págs. 182-193. 1998.
27. **R. Martínez-Espinosa, J. Cole, D. Richardson and N. Watmough.** [Enzymology and Ecology of the Nitrogen Cycle] *Biochemical Society*, Vol. 39. 2011.
28. **J. Pacheco, R. Pat y A. Cabrera.** [Análisis del ciclo del nitrógeno en el medio ambiente con relación al agua subterránea y su efecto en los seres vivos] *Ingeniería*, Vol.6, 3. págs 73.81. 2002.
29. **S. Alegret M. del Valle y A. Merkoci.** [Sensores electroquímicos] *Universitat autònoma de Barcelona*, 1 era edició. Barcelona- España. págs 67-70. 2004.
30. **C.García. M. B. González y A.** [Los biosensores electroquímicos; herramientas de la analítica y del diagnóstico clínico] *Universidad de Oviedo*. págs. 197-222. <https://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/1068/1065> (19/06/16).
31. **M. D. Roldán R.B. Plá, M. J. Huertas, F. J. Caballero, C. M. Vivián, M. M. Luque** [Biotecnología ambiental]. 1era edición. Editorial Tébar, Madrid- España. págs 413-416. 2005.
32. **O. Gonzales, S. Quishpe, R. Pozo y P. Álvarez.** [Instrumentación biomédica, biosensores]. Facultad de ingeniería eléctrica y electrónica. págs 1-8. <http://es.slideshare.net/StalinQs/biosensores> (27/11/15).
33. **J. G. Ruiz.** [Desarrollo de biosensores enzimáticos miniaturizados para su aplicación en la industria alimentaria]. Tesis doctoral. *Universidad Autónoma de Barcelona*. España. 2006.
34. **J. Coatrini A. Brisolari, V. da Cruz, E. Aparecido, D. Goncalves.** [Amperometric urea biosensors based on the entrapment of urease in polypyrrole films]. *Reactive & Functional Polymers*. Vol. 72. págs. 148-152. 2012.
35. **K. Gabrovska J. Ivanov, I. Vasileva, N. Dimova, T. Godjevargova.** [Immobilization of urease on nanostructured polymer membrane and preparation of urea amperometric biosensor]. *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol. 48, 4. págs. 620-626. 2011.
36. **Y. Velichkova, Y. Ivanov, I. Marinov, R. Ramesh, N. Ramudu, N. Dimcheva, E. Horozova, T. Godjevargova.** [Amperometric electrode for determination of urea using electrodeposited rhodium and immobilized urease]. Vol. 69. págs 168-175. 2011.
37. **A. Arias, H. Velazco** [Física, Seminarios 2015] *Universidad Nacional de San Luis*. <http://www0.unsl.edu.ar/~cornette/Libro%20Seminarios%202015.pdf>. (20/09/16).



38. **D. Chirizzi, C. Malitesta.** [Potentiometric urea biosensor based on urease immobilized by an electrosynthesized poly(o-phenylenediamine) film with buffering capability]. *Sensors and Actuators*. Vol. 157. págs. 211-215. 2011.
39. **S. Kumar Jha A. Topkar, S. D'Souza** [Development of potentiometric urea biosensor based on urease immobilized in PVA-PAA composite matrix for estimation of blood urea nitrogen (BUN)]. *J. Biochem. Biophys. Methods*. Vol. 70. págs. 1145-1150. 2008.
40. **U. Trivedi, D. Lakshminarayana, I. Kothari, N. Patel, H. Kapse, K. Makhija, P. Patel, C. Panchal** [Potentiometric biosensor for urea determination in milk]. *Sensors and Actuators*, vol. 140. págs 260-266. 2009.
41. **E. Torres Ramírez A. Méndez Albores.** [Biosensores enzimáticos]. *Revista digital universitaria*. Universidad Nacional Autónoma de México. <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art97/> (03/11/16).
42. **M. Arroyo.** [Inmovilización de enzimas. fundamentos, métodos y aplicaciones]. Vol.39,2. págs 23-29. Madrid. 1998.
43. **A. Navarro, A. Manrique, E. Iparraguirre, C. Díaz, C. Jacinto, N. Cuizano y B. P. Llanos** [Síntesis y caracterización de quitosano cuaternario nativo y reticulado en polvo para su aplicación en la adsorción de aniones metálicos]. *Rev Soc Quím Perú*, Vol. 76,4 págs 313-321. 2010.
44. **C. Lárez.** [Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y futuro]. Vol. 1,2. págs 15-21. 2006.
45. **R. Marguerite.** [Chitin and Chitosan: Properties and applications]. *Prog. Polym. Sci*. Vol. 31. págs. 603-632. 2006.
46. **J. Magalhaes A. Machado.** [Urea potentiometric biosensor based on urease immobilized on chitosan membranes] *Talanta*. Vol. 47. págs. 183-191. 1998.
47. **A. Mulyasuryani, A. Roosdiana and A. Srihardyastutie** [The potentiometric urea biosensor using chitosan membrane] *Indo. J. Chem.*. Vol. 10,2. págs. 162-166. 2010.
48. **A. J. Reviejo y J. M. Pingarrón.** [Biosensores electroquímicos, una herramienta útil para el análisis medioambiental, alimentario y clínico]. Universidad Complutense de Madrid. - Madrid- España <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/867274.pdf> (15/08/16).
49. **L. Aguí J. Manso, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón** [Colloidal- gold cysteamine-modified carbon paste electrodes as suitable electrode materials for the electrochemical

determination of sulphur- containing compounds Application to the determination of methionine] *Talanta*, Vol. 64. - págs. 1041-1047. 2004.

50. **Raj Bikash Kumar Jena and C. Retna** [Enzyme-Free amperometric sensing of glucose by using gold nanoparticles]. *Chem.Eur.J.* Vol. 12. págs. 2702-2708. 2006.

51. **A. Tiwari, S. Aryal, S. Pilla, S. Gong** [An amperometric urea biosensor based on covalently immobilized urease on an electrode made of hyperbranched polyester functionalized gold nanoparticles]. *Talanta*. Vol. 78. págs. 1401-1407. 2009.

52. **A. Wong. A. Razzino. A. Silva and O. Fatibello-Filho.** [Square-wave voltammetric determination of clindamycin using a glassy carbon electrode modified with graphene oxide and gold nanoparticles within a crosslinked chitosan film]. *Sensors and Actuators B: Chemical*. Vol. 231. Págs 183-193. 2016.

53. **P. Sánchez.** [Suelos del trópico: Características y manejo]. John Wiley Sons, 1 era. págs 198-199. 1981.

54. **A. Maiz Padrón.** [Estudio electroquímico de una proteína antigénica recombinante de trypanosoma cruzi, relacionada con el diagnóstico de la enfermedad de chagas]. Tesis de licenciatura . Universidad de los Andes. Mérida- Venezuela. 2012.

55. **M. El- Hefnawy M. Sakran, A. Ismail and E. Fahmy.** [Extraction, purification, kinetic and thermodynamic properties of urease from germinating pisum sativum L. seed, BMC Biochemistry]. *BMC Biochemistry*. Vol.15, 15. págs. 1471-2091. 2014.

56. **P. C. Williams.** [The colorimetric determination of total nitrogen feeding stuffs] Vol. 89. págs 276-281. 1964.

57. **C. García, F. Contreras.** [Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos. Medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana]. Aedos. págs. 135-138. Madrid-Barcelona. 2003.

58. **B. Rodríguez.** [Biosensores en la industria]. Lulu.com. 1era edición. págs. 13-15.2012.

59. **R.W. Murray.** [Chemically modified electrodes]. *Acc.Chem.Res.* Vol. 13. págs. 135-141. 1980.

60. **A.D. Jannakodakism, P.D. Jannakoudakis and E. Theodoridou** [Electrochemical oxidation of carbon fibres in aqueous solutions and analysis of the surface oxides]. *J. Appl. Electrochem.* Vol. 20. págs. 619-624. 1990.

61. **T. Atogushi, A. Aramata, A. Kazusaka and M. Enyo.** [Electrocatalytic activity of Co(II) Tpp-pyridine complex modified carbon electrode for CO<sub>2</sub>]. J. Electroanal. Chem. - vol. 318. págs. 309-320. 1991.
62. **G. Dryhurst, K. M. Kadish, F. Scheller, R. Renneberg.** [Biological Electrochemistry] Norman : Academic Press, 1era edición. Vol. I . págs. 12-14. 2012.
63. **M. Revenga.** [Síntesis y caracterización de ligandos hidroxilados de base de schiff. Aplicación al desarrollo de sensores y biosensores]. Química analítica y análisis instrumental ; Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Madrid. - Madrid- España . 2009.
64. **W. Orozco, Y. Martínez, R. Hernández, C. Rojas, E. Millán.** [Modificación química de un electrodo de carbón vítreo con meso-tetrafenilporfirina de hierro (III) para estudiar la reducción de dióxido de carbono y la oxidación de ácido fórmico]. Avances en Química. Vol. 8, 3. págs. 121-130. 2013.
65. **H.A. Rojas, J.J. Martínez y A.Y. Vargas.** [Selección de soportes magnéticos para la inmovilización de ureasa]. Vol. 16, 2. 2014.
66. **M. Arroyo.** [Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones]. Ars Pharmaceutica., Vol. 39, 2. págs. 23-29. 1998.
67. **D. Peña, H. Estupiñan, E. Córdoba, R. Martínez, C. Vásquez.** [Recubrimientos de quitosano / fosfato de calcio obtenidos por electrodeposición sobre una aleación de titanio]. Rev. fac. ing. univ. Vol. 54. Antioquia- Medellín. 2010.
68. **D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman.** [Principios de análisis instrumental] 6ta edición. Mc Graw Hill. Madrid. págs 659-670. 2008.
69. **S. Menolasina.** [Fundamentos y aplicaciones de electroquímica] Consejo de publicaciones, Universidad de los Andes, Mérida- Venezuela. 2004.
70. **R. Villalonga, P. Diez, P. Yáñez-Sedeño, M. Eguilaz, S. Casado and J. M. Pingarrón.** [Electrodos funcionalizado con redes de nanopartículas de oro electropolimerizadas para el diseño de biosensores enzimáticos] Universidad Complutense de Madrid. España. . <http://www.uclm.es/actividades/2011/vnyna/pdf/sesion1.pdf> (10/11/16).

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)