



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

Desarrollo de un biosensor para la determinación de ácido oxálico en orina basado en un soporte magnético enzimático utilizando un complejo de Fe(II)-Bmp como mediador.

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

Licenciado en Química

PRESENTA:

Juan Ignacio Román Olvera

DIRECTOR:

Dr. José Antonio Rodríguez Ávila

CO-DIRECTOR:

Dr. Prisciliano Hernández Martínez

Pachuca, Hgo.

2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
Licenciatura en Química

M. en A. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO,
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DE LA U.A.E.H.,
Presente:

Por este medio le comunico que el Jurado asignado a el pasante de Licenciatura en Química, **Juan Ignacio Román Olvera** quien presenta el trabajo de titulación **“Desarrollo de un biosensor para la determinación de ácido oxálico en orina basado en un soporte magnético enzimático utilizando un complejo Fe(II)-Bmp como mediador.”** después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación firman de conformidad los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE: **M. en C. Araceli Sierra Zenteno**
PRIMER VOCAL: **Dr. José Antonio Rodríguez Ávila**
SEGUNDO VOCAL: **Dra. María Elena Páez Hernández**
TERCER VOCAL: **Dra. Verónica Salazar Pereda**
SECRETARIO: **Dr. Carlos Andrés Galán Vidal**
PRIMER SUPLENTE: **Dr. Javier Añorve Morga**
SEGUNDO SUPLENTE: **Dr. Gian Arturo Álvarez Romero**

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE

“Amor, Orden y Progreso”

Mineral de la Reforma, Hidalgo a 20 de Mayo de 2013.

M. en C. Araceli Sierra Zenteno.
Coordinadora Adjunta de la Lic. en Química.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE HIDALGO



CENTRO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICAS

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería,
Carretera Pachuca - Tulancingo Km. 4.5, Ciudad del Conocimiento,
Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
Tel. +52 771 7172000 ext. 2218
asierra@uaeh.edu.mx





Este trabajo de investigación se realizó en los laboratorios 1 y 2 del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Parte de este trabajo ha sido presentado en:

XXV Congreso Nacional de Química Analítica (2012), con el trabajo:
“APLICACIÓN DE Fe(II)-(BIS(2-TIOPIRIDONA)BORATO) AL DESARROLLO DE UN BIOSENSOR DE ÁCIDO OXÁLICO”

IV Congreso Nacional de Ciencia e Ingeniería en Materiales (2013), con el trabajo:
“APLICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS AL DESARROLLO DE UN BIOSENSOR DE ACIDO OXÁLICO”

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi padre Ignacio Román Meneses, a mi madre Eva Reyna Olvera Olvera y a mis hermanas Yasmín Yaneth Román Olvera y Eva Isabel Román Olvera, quienes fueron partícipes de forma directa e indirecta en mi formación. Sin su compañía y apoyo no hubiera sido posible lograr lo que he obtenido hasta ahora y no puedo dejar pasar la oportunidad para decirles que los amo muchísimo.

Agradezco de manera especial a mi director de tesis el Dr. José Antonio Rodríguez Ávila, por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo, por su orientación y ayuda que me otorgó siempre y por su apoyo y amistad que me permitieron aprender mucho más de lo que estudié para este proyecto.

A mi co-director el Dr. Prisciliano Hernández por su disponibilidad, paciencia y ayuda que me concedió en todas las etapas del proyecto, su participación activa en esta tesis ha enriquecido el trabajo realizado y ha significado el surgimiento de una buena amistad.

A mi jurado el Dr. Carlos Andrés Galán Vidal, la Dra. María Elena Páez Hernández, la Dra. Verónica Salazar Pereda, el Dr. Gianni Arturo Álvarez Romero, la M. en C. Araceli Sierra Zenteno y al Dr. Javier Añorve Morga que no solo en la evaluación de este proyecto, sino también con sus consejos y resolución de dudas he logrado presentar un trabajo digno de nuestra institución a la que pertenecemos.

A mis compañeros de Laboratorio Israel, Gaby, Evelin, Don Yu, Nancy, Julie, Irmita, Juan Manuel, Lupita, Iris, Angie y Sergio que cada quien aportó ayuda, consejos y compañía en esos días de trabajo dentro de ese recinto del Área Académica de Química.

A amigos de la carrera y espero del resto de mi vida los Fots Chino, Yoarhy, Rigo, Geovani, Calero, Mata, Fer y Sergio, y a mis lindas amigas Viri, Sony y Mariana porque más allá brindarme su amistad, compartimos momentos de diversión y alegría en esas retas en la cancha, las comidas, las horas de clase juntos y tantas experiencias que compartimos dentro y fuera de la Universidad.

Por último a mis profesores de toda la carrera que con sus enseñanzas y esfuerzo conforman una parte esencial de este logro. Y a todas aquellas personas que me brindaron palabras de aliento para continuar con mi trabajo y que por el momento no los he recordado en esta pequeña sección de agradecimientos.

Índice

Índice

1 ANTECEDENTES	2
1.1 Métodos de análisis de oxalato en orina.....	6
1.1.1 Valoración Redox.....	6
1.1.2 Espectrometría UV-Vis.....	7
1.1.3 Electroforesis Capilar.....	7
1.1.4 Cromatografía.....	8
1.2 Biosensores.....	8
1.2.1 Biosensores electroquímicos.....	10
1.3 Introducción a las técnicas de flujo.....	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo General.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 PARTE EXPERIMENTAL	23
3.1 Equipos.....	23
3.2 Síntesis de Fe(II)-(bis(2-tiopiridona)borato).....	24
3.3 Síntesis del soporte enzimático magnético.....	24
3.4 Modificación de los electrodos de carbono.....	25
3.5 Construcción del Biosensor.....	26
3.6 Análisis de muestras.....	26
3.7 Análisis por Inyección en Flujo.....	27
4 RESULTADOS Y DISCUSIONES	29
4.1 Caracterización del Complejo Fe(II)-(bis(2-tiopiridona)borato).....	29
4.1.1 Infrarrojo.....	29
4.1.2 Espectrometría de masas de alta resolución.....	30
4.1.3 Voltamperometría cíclica.....	33
4.2 Caracterización del soporte magnético.....	35
4.2.1 Infrarrojo.....	35
4.2.2 Difracción de rayos X de polvo.....	36
4.2.3 Microscopía electrónica.....	37
4.3 Optimización del sistema de análisis en discontinuo.....	38
4.3.1 Optimización del pH.....	38

Índice

4.3.2	Optimización del potencial.....	39
4.3.3	Cronoamperometría	40
4.4	Optimización del sistema de análisis en flujo (FIA)	43
5	CONCLUSIONES	49
6	REFERENCIAS	51

Índice

Índice de Figuras

Figura 1	Esquema de las vías de producción celular de oxalato	3
Figura 2	Esquema general de un Biosensor.....	9
Figura 3	Ciclo Catalítico para la detección de Oxalato con la enzima Oxalato Oxidasa.....	14
Figura 4	Par Redox Ferroceno/Ferricinio.....	16
Figura 5	Hidrotris(2-tiopiridona)borato de potasio y Dihidrobis(2-tiopiridona)borato de sodio.....	17
Figura 6	Elementos básicos de un sistema en flujo.	20
Figura 7	Análisis de muestras de ácido oxálico.....	27
Figura 8	Esquema del montaje FIA utilizado en la determinación de ácido oxálico.	27
Figura 9	Espectro Infrarrojo del complejo Fe(II)-(bis(2-tiopiridona)borato).....	29
Figura 10	Espectrometría de masas de alta resolución del complejo metálico.	30
Figura 11	Reducción del Fe(III) a Fe(II) y Formación del complejo $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{B}(\text{mp})_2)(\text{H}_2\text{O})_3]^+$	31
Figura 12	Difracción de rayos X de monocristal del dímero $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{S}_2$	32
Figura 13	Voltamperograma del electrodo modificado con Fe(III)-(tris(2-tiopiridona)borato) en ausencia y presencia de H_2O_2	33
Figura 14	Espectro FTIR del soporte magnético enzimático. a) magnetita, b) magnetita cubierta con silica gel y c) soporte magnético con la enzima inmovilizada. ...	35
Figura 15	Patrones de difracción para el soporte magnético. (m: líneas de difracción características para magnetita.	36
Figura 16	Micrografía (SEM) del soporte magnético. (b) Micrografía (TEM) del soporte magnético.	37
Figura 17	Intensidad de la señal para el pico catódico en Voltamperometría cíclica evaluado a diferentes valores de pH.....	38
Figura 18	Pendiente de la señal con el incremento de la $[\text{H}_2\text{O}_2]$ en Cronoamperometría evaluada a diferentes valores de Potencial.....	39
Figura 19	Cronoamperometría obtenidas del análisis del ácido oxálico utilizando el biosensor propuesto.	40
Figura 20	Efecto de la interacción de factores control en los valores de V.I., V.F., L.R. y [Enz]..	45
Figura 21	FIAgrama de la inyección de soluciones estándar de ácido oxálico en solución tampón de acetatos (pH 4.0, 0.1 M).	47

Índice

Índice de Tablas

Tabla 1	Factores urinarios etiológicos y su relación con cada tipo de cálculo.....	4
Tabla 2	Ejemplos de electrodos de substrato enzimático.	12
Tabla 3	Ejemplos de sensores amperométricos.	13
Tabla 4	Potenciales Redox de algunas reacciones importantes a pH 7.	16
Tabla 5	Algunos biosensores de oxalato reportados.....	18
Tabla 6	Parámetros geométricos del dímero	32
Tabla 7	Parámetros de regresión de las líneas de calibrado para [(COOH) ₂].	41
Tabla 8	Intervalos de concentración encontrados para muestras de orina.	42
Tabla 9	Factores y niveles seleccionados para la optimización.....	44
Tabla 10	Matriz de diseño ortogonal L9 (3 ⁴) utilizada para la optimización de los parámetros analíticos que intervienen en la determinación amperométrica enzimática del ion oxalato.	45
Tabla 11	Parámetros de regresión de la línea de calibrado, altura (nA) vd concentración de ácido oxálico (mg l ⁻¹).	47

ANTECEDENTES



1 ANTECEDENTES

El riñón es un órgano que desempeña diversas funciones fundamentales para el mantenimiento de la vida del individuo, a través de la interacción con algunos líquidos que componen al organismo. En este sentido cabe destacar acciones como la regulación de electrolitos y del agua del medio interno, el pH, la eliminación de los productos finales del metabolismo protéico y la regulación de la tensión arterial.

Los líquidos que integran el organismo de un individuo se pueden dividir en dos grandes compartimientos:

1) Compartimiento intravascular:

Incluye los líquidos que circulan por los vasos sanguíneos.

2) Compartimiento intersticial:

Incluye los líquidos exteriores a los vasos sanguíneos que bañan el exterior de las células.

El líquido que se encuentra dentro de las células permanece en constante intercambio con el intersticial, a través de procesos activos los cuales se ven afectados por estrechos márgenes de variación de factores como la ingesta o pérdida de H₂O y electrolitos, así como el ingreso de productos finales del metabolismo de las células que deben ser eliminados.

El riñón juega un papel fundamental estabilizando el volumen y las constantes fisicoquímicas del líquido extracelular a través de la formación de la orina por medio de un ultrafiltrado del plasma sanguíneo.

En general la orina contiene urea y otras sustancias químicas orgánicas e inorgánicas disueltas en agua (95% de agua y 5% de solutos). Aunque no forman parte del plasma filtrado originalmente, existen otros elementos presentes en este

líquido como células, cilindros, cristales, moco y bacterias. Un importante compuesto que origina la formación de cristales es el ión oxalato, el cual está presente en la orina por que el metabolismo humano (Figura 1) convierte a sustancias como la glicina y la vitamina C en oxalatos [1].

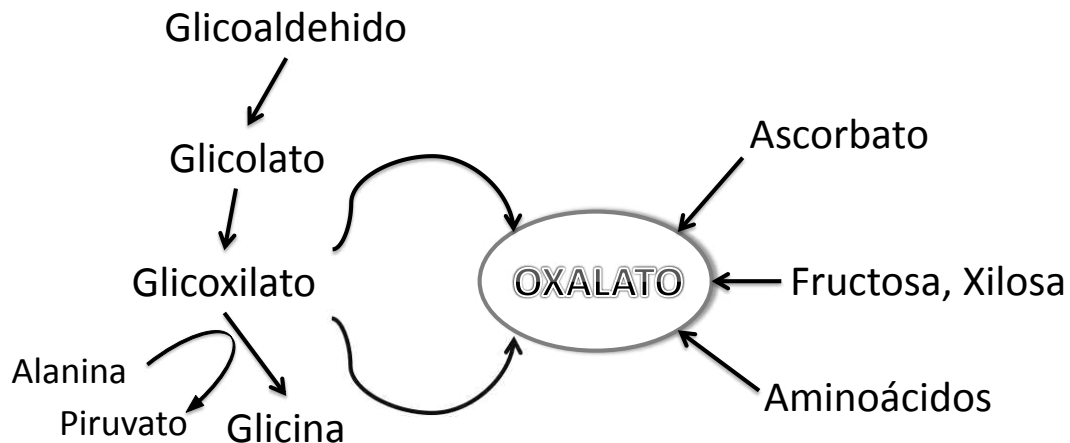


Figura 1. Esquema de las vías de producción celular de oxalato.

El ácido oxálico (cuya fórmula química es HOOC-COOH) es un ácido orgánico fuerte utilizado en el metabolismo tanto de plantas como animales. El nombre de oxalato se le dio debido a que fue aislado por primera vez de la planta *Oxalis*. Dentro de las plantas, el oxalato es el principal regulador de la concentración de calcio dentro de los tejidos vegetales. En contraste, en los animales este compuesto se presenta como un producto metabólico final poco útil.

Este compuesto orgánico en su forma dihidratada ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) tiene un aspecto de cristales higroscópicos, con un peso molecular de 126.07 g/mol, mientras que su forma anhidra ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$) tiene un peso molecular de 90.03 g/mol y tiene aspecto de polvo blanco. La naturaleza ácida de sus grupos carboxilo le genera dos valores de pka en 1.25 y 4.29 [2].

El oxalato tiene la habilidad de formar sales con varios iones como el sodio, potasio, magnesio y calcio. Las tres primeras especies forman compuestos solubles en agua, mientras que el oxalato de calcio es de baja solubilidad

($8.76 \times 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$ a 37°C) [3]. La mayoría de las piedras (cálculos) renales están compuestos principalmente de oxalato de calcio, el cual puede estar presente en su forma monohidratada o dihidratada. El compuesto monohidratado se encuentra principalmente en pacientes con hiperoxaluria primaria, mientras la forma dihidratada está presente en los pacientes con hipercalciuria.

La clasificación descrita por Grases y Costa [4], se muestra en la Tabla 1, que muestra las alteraciones bioquímicas de orina más frecuentemente asociadas a los distintos tipos de litiasis. Los cálculos más frecuentes son los de oxalato de calcio dihidratado (33.8%), y que principalmente están relacionados con una hipercalciuria (60%), con un pH urinario > 6 (cuando la hidroxapatita está presente, 62%). El tanto por ciento de cálculos de oxalato cálcico monohidratado es similar al dihidratado pero debe dividirse en dos grupos, los papilares (12.9%) y los no papilares o de cavidad (16.4%).

Tabla 1.- Factores urinarios etiológicos y su relación con cada tipo de cálculo.

Tipo de cálculo	Alteraciones urinarias más frecuentes
Oxalato cálcico monohidratado papilar	- déficit en la orina de inhibidores de la cristalización - pH urinario > 6.0 (cuando se detecta hidroxapatita)
Oxalato cálcico monohidratado no-papilar (formado en cavidades renales)	- déficit en la orina de inhibidores de la cristalización - pH urinario > 6.0 (cuando se detecta hidroxapatita) o pH < 5.5 (cuando se detecta ácido úrico)
Oxalato cálcico dihidratado	- hipercalciuria - hiperoxaluria - déficit en la orina de inhibidores de la cristalización - pH urinario > 6.0 (cuando se detecta hidroxapatita)
Cálculos mixtos de oxalato cálcico dihidratado e hidroxapatita	- hipercalciuria - pH urinario > 6.0 - hipocitraturia
Cálculos mixtos de oxalato cálcico y ácido úrico	- déficit en la orina de inhibidores de la cristalización - pH urinario < 5.5 - hiperuricuria

La cantidad de ión oxalato excretado en la orina está determinada por la edad, ingesta diaria, rasgos genéticos, la absorción intestinal, la secreción tubular renal y la velocidad de la síntesis endógena [5]. Dependiendo de la dieta, la excreción de oxalato por día en voluntarios sanos varía de 0.10 a 0.45 mmol/día en orina y una concentración de 0.8–2.5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ en plasma sanguíneo [6].

La excreción renal ha sido pensada como la única vía para la excreción de oxalato, sin embargo se ha demostrado que el intestino es capaz de secretar oxalato. La secreción intestinal parece ser una importante vía de excreción de oxalato en la enfermedad renal de fase terminal o de otros estados con elevados niveles de oxalato en suero [7,8].

La determinación de ácido oxálico presente en la orina es de interés clínico ya que la concentración se asocia a litiasis renal e hiperoxaluria primaria o secundaria [9]. Además, se ha encontrado evidencia de que el aumento en su concentración favorece la excreción de una enzima urinaria que causa daño en células tubulares renales en pacientes con cálculos [10].

La litiasis renal es un problema de salud importante en el mundo occidental, donde afecta al 12% de los hombres y el 6% de las mujeres durante sus vidas. Los cálculos renales son responsables de alrededor del 10% de los ingresos hospitalarios urológicas anuales y representan un importante número de visitas a los departamentos de emergencia de los hospitales [11].

Los casos anteriores de enfermedad hacen de especial importancia el desarrollo de nuevas técnicas analíticas para la determinación cuantitativa lo suficientemente precisa, estable y fiable de este analito, que reduzca la necesidad de emplear instrumentación relativamente cara o de personal altamente calificado.

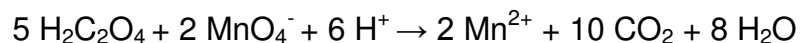
1.1 Métodos de análisis de oxalato en orina

Existe una serie de métodos para la determinación de este metabolito tales como titulación, espectrofotometría, electroforesis capilar, cromatografía iónica y HPLC. Los métodos enzimáticos con detección espectrofotométrica y electroquímica se prefieren debido a la especificidad que presentan. A continuación se describen algunas de las metodologías utilizadas para el análisis de este componente.

1.1.1 Valoración Redox

El método para el análisis del contenido de oxalato en orina descrito por Archer [12], refiere un pretratamiento de la orina filtrándola con papel Whatman No. 1, elevando su pH entre 7.0 y 8.0 con una solución amoniacal 8.0 N y después reajustando el valor de pH a 5.0 con una solución de ácido acético 6.0 N. Posteriormente se adicionan 2.0 ml de una solución de CaCl₂ (5.0%) y se deja reposar la muestra durante 12 horas, a una temperatura de 4.0 °C. Transcurrido el tiempo se centrifuga 15 minutos a 3000 revoluciones/minuto, se separa por decantación el precipitado y se suspende éste en 4.0 ml de una solución amoniacal 0.35 N, agregando después 2.0 ml de H₂SO₄ 0.7 N. La mezcla se calienta a 80°C y se valora con permanganato de potasio.

El ácido oxálico es un compuesto que puede actuar como un agente reductor del ión permanganato, y puede ser utilizado como patrón primario para la normalización de las soluciones de permanganato de potasio (KMnO₄). La temperatura de la mezcla de la valoración debe ser superior a 60°C para garantizar que todo el permanganato añadido reaccione rápidamente. La cinética de la reacción es compleja y los iones de Mn²⁺ formados catalizan la nueva reacción entre el permanganato y el ácido oxálico. La ecuación final en medio ácido es la siguiente:



1.1.2 Espectrometría UV-Vis

La determinación de oxalatos mediante espectroscopia UV-Vis otorga ventajas económicas y prácticas frente a otro tipo de detectores ya que las reacciones algunas veces son selectivas, proporcionan límites de detección adecuados y la instrumentación necesaria es de fácil manejo y accesible.

Un método usualmente ocupado para la determinación de este analito en plasma sanguíneo es el enzimático, el cual emplea la enzima oxalato oxidasa (OxOx) y cuantifica la concentración de peróxido de hidrógeno formado, realizándose la determinación de ácido oxálico de manera indirecta [13]. El peróxido formado reacciona con el ácido 3-(dimetilamino) benzoico y la 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona en presencia de peroxidasa a pH 3.1. La mezcla se incuba 5 minutos a 37°C y posteriormente se obtienen las absorbancias en un espectrofotómetro a 590 nm [14]. Finalmente la determinación se realiza mediante interpolación en la línea de calibrado.

1.1.3 Electroforesis Capilar

Esta técnica de separación también permite la determinación del ión oxalato, generalmente se obtienen tiempos de análisis bastante bajos si se compara con otras técnicas separativas como la cromatografía de gases o la de líquidos. Además el consumo de muestra y reactivos es menor por lo que se le puede considerar una técnica más limpia. Es versátil ya que se puede emplear para separar cualquier tipo de compuesto eligiendo adecuadamente el detector.

Una técnica para la cuantificación directa del ion oxalato se basa en electroforesis capilar de zona [15]. En esta se emplea un capilar de sílice fundida de 75 μm de diámetro interno y como electrolito soporte una solución tampón de fosfatos (0.5 mol.l^{-1} , pH 6.5). La separación se realiza mediante polaridad inversa a 30 kV, detectando la señal a 195 nm. El intervalo lineal de trabajo reportado es de 2.0 a 10.0 mg.l^{-1} , con un límite de detección de 0.5 mg.l^{-1} y un límite de cuantificación de

1.5 mg.l⁻¹. El método fue aplicado al análisis de orina. Las muestras se diluyen 1:5 con HCl (40 mmol.l⁻¹) y se filtran previamente a su análisis.

1.1.4 Cromatografía

Las técnicas cromatográficas son elegidas cuando se requiere la determinación conjunta de ácidos orgánicos [16]. La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) ha sido aplicada por diversos grupos de investigación para la determinación de ácidos orgánicos. Las longitudes de onda de detección la región UV no son uniformes, lo que limita su aplicación.

Una metodología para la determinación simultánea de ácido oxálico y ácido cítrico mediante HPLC-UV emplea en el análisis una columna de RP18 (250X4mm, 5µm) utilizando como fase móvil una solución de KH₂PO₄ (0.25%) y sulfato ácido de tetrabutil amonio (0.0025 M) en solución tampón de ácido ortofosfórico (pH 2.0). La detección se realiza a 210 nm utilizando un volumen de inyección de 20 µl. Las muestras de orina colectadas de los pacientes durante 24 horas se mezclan con 10.0 ml de HCl (6.0 M), seguido de una desproteinización de las muestras tomando mezclando 1.0 ml de orina con 50 mg de ácido sulfosalicílico y filtrando después de 10 min. El intervalo lineal de esta metodología es de 0.0 – 16.0 µmol/ml, con un coeficiente de correlación de 0.999, un límite de detección de 8.0 nmol/ml (para oxalato) y 40 nmol/ml (para citrato) [17].

1.2 Biosensores

Por definición los biosensores son dispositivos que se utilizan para la detección de un analito y están comprendidos por una interfase selectiva, que se encuentran en contacto directo a un transductor, el cual realiza la interacción entre el analito y la superficie directamente o por medio de un mediador [18].

En su conjunto, estos dispositivos son herramientas analíticas de bajo costo, selectivas, específicas, rápidas y sencillas de operar, además forman parte de la tecnología emergente que es ideal para análisis clínicos ya que ofrecen la posibilidad de realizar análisis en tiempo real, lo cual es importante para algunas mediciones médicas de algunos analitos corporales.

La base de los biosensores es el acoplamiento de un compuesto inmovilizado que es biológicamente activo, con un transductor de la señal y un amplificador. La principal función del transductor es convertir los cambios fisicoquímicos que sucedan en el compuesto activo, como resultado de la interacción con el analito, en una señal de salida. La configuración básica de un biosensor, se muestra en la figura 2.

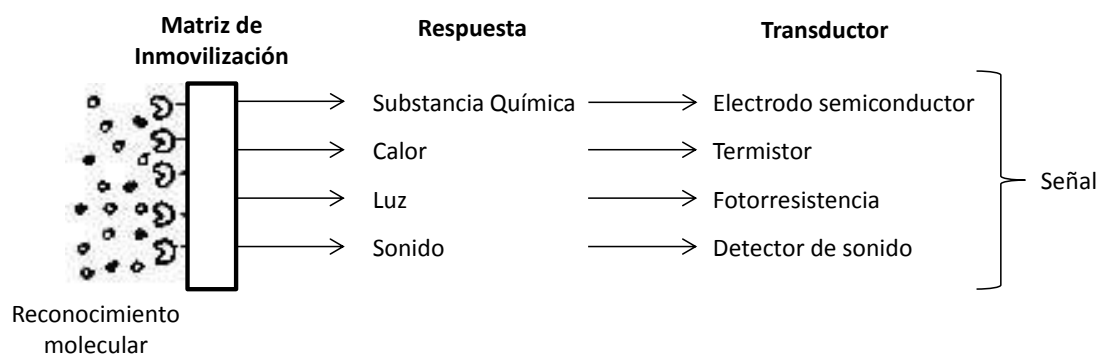


Figura 2. Esquema general de un Biosensor.

Basado en el tipo del transductor empleado para la correcta cuantificación de la respuesta al analito, los biosensores se pueden clasificar en ópticos, calorimétricos, piezoeléctricos y electroquímicos.

Los biosensores ópticos se basan en la medición de la luz absorbida o emitida por un compuesto como consecuencia de una reacción bioquímica. En estos biosensores, las ondas de luz son guiadas por fibras ópticas hacia los detectores adecuados [19]. Este tipo de biosensores se utilizan para la medición de pH, O₂, CO₂, etc.

Los biosensores calorimétricos detectan al analito sobre la base del calor emitido por la reacción bioquímica del compuesto con la enzima adecuada. Recientemente algunos circuitos integrados con estructuras sensibles a la temperatura, han sido modificados con enzimas. Diferentes substratos, vitaminas, enzimas y antígenos se han determinado usando biosensores termométricos [20]. Una desventaja a considerar en este tipo de sistemas es que en la mayoría se observa una pérdida del calor generado en la reacción enzimática, por el contacto con la solución que los rodea.

Los biosensores piezoeléctricos operan principalmente gracias a la generación de dipolos eléctricos al someter un cristal anisótropo natural al estrés mecánico. La adsorción del analito aumenta la masa del cristal y altera su frecuencia de oscilación básica. Estos dispositivos son usados para medir compuestos como el amonio, óxido nitroso, monóxido de carbono, hidrógeno, metano y algunos compuestos organofosforados [21].

Todos estos biosensores tienen ciertas desventajas, por ejemplo, los ópticos a pesar de ser muy sensibles no se pueden emplear en medios turbios; los térmicos no se pueden utilizar en sistemas cuyo cambio de calor sea muy pequeño para detectar, además de que su aplicación en muestras reales es compleja. Por ello es que los biosensores electroquímicos se han convertido en los dispositivos más comúnmente utilizados ya que en estos se ha encontrado la manera de superar las desventajas que impiden el uso de los otros métodos, además de que sus análisis se pueden llevar a cabo de manera rápida, fácil y con un bajo costo económico, un ejemplo convencional es el glucómetro.

1.2.1 Biosensores electroquímicos

Los biosensores electroquímicos son los dispositivos más utilizados; el tipo de detección usualmente es potenciométrico o amperométrico. Su construcción se basa en la modificación de superficies electroactivas con materiales biológicos

de reconocimiento molecular, las cuales interactúan con el analito de interés, consumiendo o generando especies electroactivas que pueden ser detectadas y cuantificadas mediante alguna técnica electroanalítica.

Estos dispositivos pueden aplicarse en medios turbios o con coloración, tienen una sensibilidad comparable con otros tipos de biosensores y son más susceptibles a ser miniaturizados.

Dependiendo de la propiedad electroquímica a ser medida, los biosensores electroquímicos pueden dividirse además en: conductimétricos, potenciométricos y amperométricos. Los biosensores conductimétricos se encargan de medir los cambios en la conductividad entre un par de electrodos metálicos, como consecuencia de los cambios en el componente biológico del biosensor [22].

Los biosensores potenciométricos consisten en la medición de potenciales en el electrodo de trabajo con respecto al electrodo de referencia. Funcionan en condiciones de equilibrio y determinan el potencial a corriente nula producido en la superficie del electrodo de trabajo.

En el caso de los biosensores amperométricos, éstos determinan los cambios de corriente en el electrodo de trabajo debido a la oxidación directa de los productos de una reacción bioquímica. La detección amperométrica tiene la ventaja de manera general de ser la más sensible que las dos anteriores.

1.2.1.1 Biosensores Potenciométricos

Los biosensores potenciométricos son de costo moderado y pueden ser construidos en el laboratorio. Existen tres principales tipos de electrodos potenciométricos: los selectivos de iones (ISE), los transistores de efecto de campo sensibles químicamente (ISFET) y los sensibles a gases (GSE). Los más utilizados son los que emplean ISEs como dispositivo de detección.

Un ejemplo común de un ISE es el electrodo de vidrio utilizado para la medida del pH. En él, la membrana selectiva es una fina pared de vidrio hidratado, que separa dos soluciones a distinto pH: la interna con actividad constante y la de la muestra con actividad desconocida.

Es posible transformar el ISE, en un sensor de moléculas aportando la selectividad de una enzima para el reconocimiento de un analito. La cuantificación del analito (substrato enzimático), se realiza de manera indirecta a través de la reacción entre la enzima y el analito, generando iones que pueden ser detectados gracias al uso de un sensor potenciométrico. Algunos biosensores potenciométricos basados en enzimas se presentan en la Tabla 2 [23]:

Tabla 2.- Ejemplos de electrodos de substrato enzimático.

Substrato	Enzima	ISE utilizado
Urea	Ureasa	NH_4^+
Penicilina	Penicilinasas	pH
Glucosa	Glucosa oxidasa	I^-
Amigdalina	β -Glucosidasa	CN^-
Oxalato	Oxalato descarboxilasa	CO_2

Algunos factores importantes que deben considerarse en estos dispositivos es la capacidad amortiguadora del medio de trabajo, ya que en ocasiones está en competencia con el equilibrio ácido base del producto detectado, el cual también modula la actividad enzimática. Ambos aspectos afectan directamente el intervalo de respuesta.

Un inconveniente que presentan estos biosensores es su prolongado tiempo de respuesta que puede ser de varios minutos. A pesar de esto, presentan como principal ventaja un perfil bajo de interferencias.

1.2.1.2 Biosensores Amperométricos

Estos dispositivos entran en el grupo de los dispositivos electroquímicos más utilizados. Su selectividad aunque es limitada, es suficiente para el análisis de muestras reales. La manera más adecuada de mejorar la selectividad es a través del control del potencial impuesto en el electrodo de trabajo mediante el sistema potencioestático de medida. Normalmente los biosensores amperométricos utilizan tres electrodos: trabajo, auxiliar y de referencia.

Los sensores amperométricos se basan en la modificación de los materiales transductores a través de la incorporación de elementos que le proporcionan selectividad. Esta modificación se realiza para disminuir el tiempo de reacción y permitir la detección indirecta de algunos analitos. Algunos sensores amperométricos reportados se presentan en la Tabla 3 [24].

Tabla 3.- Ejemplos de sensores amperométricos.

Analito	Enzima	Especie determinada
Glucosa	Glucosa oxidasa	H ₂ O ₂
Aminoácidos	D-Amino ácido oxidasa	H ₂ O ₂
Lactato	Lactato deshidrogenasa	NADH
Fructosa	Fructosa deshidrogenasa	NADH
Etanol	Alcohol oxidasa	H ₂ O ₂
Colesterol	Colesterol oxidasa	H ₂ O ₂
Nitrito	Nitrito reductasa	Metil Viológeno
Ácido úrico	Uricasa	H ₂ O ₂
Ácido oxálico	Oxalato Oxidasa	H ₂ O ₂

En algunas ocasiones la especie electroattractiva a detectar presenta una transferencia electrónica lenta sobre los electrodos habituales (Pt, Au o C), por lo tanto sólo se consigue una señal analítica útil cuando se impone al electrodo un potencial de trabajo superior a su potencial redox termodinámico. Éste hecho

produce una pérdida de calidad en la respuesta en términos de selectividad (posible detección simultánea de especies interferentes) y de sensibilidad (menor relación señal/ruido).

Una de las maneras más utilizadas para minimizar éste efecto es el uso de agentes de transferencia artificiales llamados mediadores, los cuales permiten utilizar potenciales de trabajo más adecuados.

1.2.1.3 Mediadores

Los mediadores son agentes artificiales de transferencia de electrones que pueden participar en la reacción redox con el componente biológico del biosensor y así acelerar la transferencia de electrones de la especie de interés hacia el transductor. Químicamente un mediador es un par redox de bajo peso molecular, el cual transporta los electrones desde el centro redox de la enzima hacia la superficie del electrodo indicador.

Durante el ciclo catalítico, la forma reducida del mediador reacciona primero con el producto catalítico de la enzima y después difunde hacia el electrodo indicador donde es rápidamente reducido de nueva cuenta. Dicha estrategia, basada en un mecanismo de difusión del mediador, se puede esquematizar de la siguiente forma tomando como ejemplo la detección del ión oxalato propuesta en este trabajo:

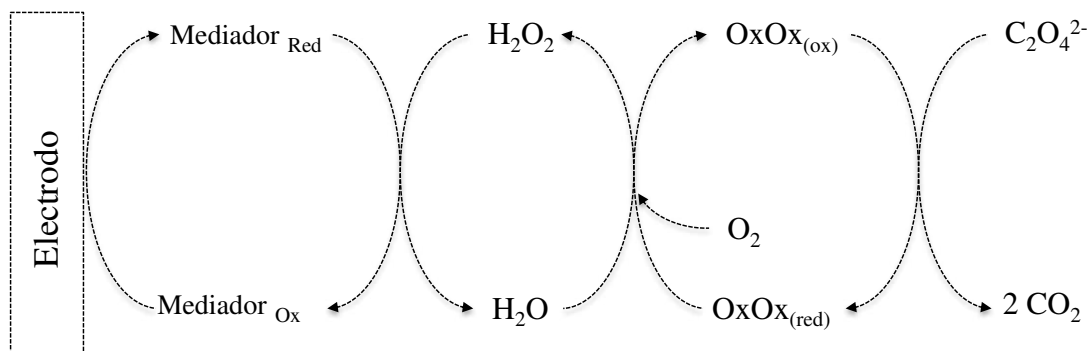


Figura 3. Ciclo catalítico para la detección de oxalato con la enzima Oxalato Oxidasa.

El mediador reducido interactúa con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generado por la reacción enzimática entre el ión oxalato ($\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$) y la enzima Oxalato Oxidasa (OxOx).

Un mediador se espera que sea estable bajo las condiciones de trabajo requeridas para el análisis y no debe de participar en reacciones secundarias durante la transferencia de electrones. El mediador debe ser elegido de tal manera que tenga un menor potencial redox que los otros interferentes electroquímicamente activos de la muestra. Algunas características adicionales de un mediador ideal son:

- a) Debe ser capaz de reaccionar rápidamente con la enzima reducida.
- b) Debe exhibir cinética heterogénea reversible.
- c) El sobrepotencial para la regeneración del mediador oxidado debe ser bajo e independiente del pH.
- d) Las formas oxidada y reducida deben ser estables.

Algunas ventajas del uso de los mediadores son:

- a) Las medidas son menos dependientes de la concentración de oxígeno.
- b) El potencial de trabajo del biosensor lo determina el potencial de oxidación del mediador.
- c) La interferencia de especies no deseadas se puede disminuir.

Algunas sustancias orgánicas como azul de metileno, fenacinas, violeta de metilo, el amarillo de alizarina, tionina y azul de toluidina, han sido utilizados como mediadores en biosensores [25-27]. La principal desventaja es que estas moléculas presentan una estabilidad baja y sus potenciales redox son dependientes del pH.

Los cationes de los metales de transición y sus complejos, se han utilizado con el propósito de remplazar al O_2 como agente de transferencia electrónica. Estos compuestos tienen potenciales de oxidación más apropiados y su concentración puede ser controlada. Diversos mediadores de este tipo se basan en complejos de hierro. Algunas reacciones importantes (a pH 7.0) de especies que pueden ser

utilizadas como mediadores se presentan en la Tabla 4 [28]:

Tabla 4.- Potenciales Redox de algunos mediadores importantes a pH 7.

Reacción	E (V) ^a
Acetato / acetaldehído	-0.60
Acetona / 2-propanol	-0.43
NAD ⁺ / NADH	-0.32
Acetaldehído / Etanol	-0.20
Fumarato / succinato	+0.03
Ferroceno / ferricinio	+0.165
O ₂ / H ₂ O ₂	+0.31
[Fe(CN) ₆] ³⁻ / [Fe(CN) ₆] ⁴⁻	+0.45
Fe ³⁺ / Fe ²⁺	+0.53

^a Respecto a electrodo estándar de hidrógeno (SHE).

Los iones libres de Fe(III) no tienen una buena actividad mediadora debido a que son susceptibles a procesos de hidrólisis y precipitación. Sin embargo, se han aplicado también complejos iónicos tales como ferricianuro [Fe(CN)₆]³⁻, para el uso como mediadores [29].

El ferroceno y sus derivados son la clase de compuestos más utilizados como mediadores en la fabricación de biosensores estables y sensibles. Este complejo organometálico de hierro tiene propiedades electroquímicas ya que puede oxidarse a ferricinio (Figura 4).

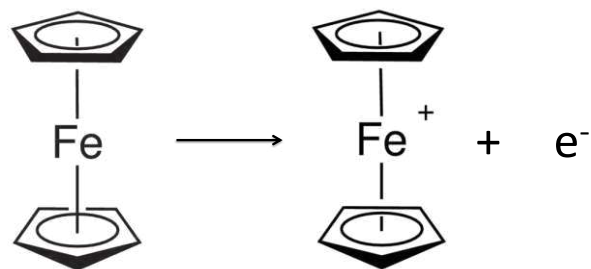


Figura 4. Par Redox Ferroceno/Ferricinio.

El anillo del ciclopentadienilo sustituido en diversas posiciones, le afecta el potencial redox del ferroceno, así como la constante de velocidad de la transferencia electrónica a la enzima.

Con base en esto se conoce otra familia de compuestos isoelectrónicos al ciclopentadienilo de tipo poli(mercaptopiridin)borato. Entre estos compuestos podemos encontrar al hidrottris(2-tiopiridona)borato de potasio (K[Tmp]) y el dihidrobis(2-tiopiridona)borato de sodio (Na[Bmp]) representados en la Figura 5 [30]. La aplicación como mediadores de compuestos derivados con este ligante no ha sido descrita en la literatura, sin embargo su similitud con el ligante ciclopentadienilo hace pensar en su posible uso en éste tipo de dispositivos.

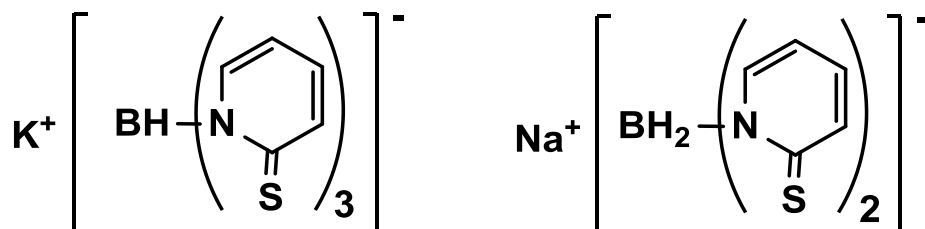
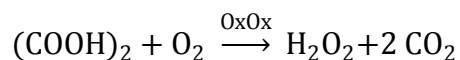


Figura 5. a) hidrottris(2-tiopiridona)borato de potasio y b) dihidrobis(2-tiopiridona)borato de sodio.

1.2.1.4 Biosensores amperométricos para oxalato

Las enzimas conocidas como oxidorreductasas catalizan reacciones transfiriendo hidrógenos o electrones y son candidatas ideales a acoplarse con transductores amperométricos. Entre los principales tipos de enzimas redox se encuentran: las oxidasas, deshidrogenasas, peroxidasas y oxigenasas.

El ión oxalato reacciona con la enzima Oxalato Oxidasa (OxOx) de acuerdo a la siguiente reacción.



El oxígeno y el H₂O₂ pueden ser el co-substrato y el producto de las reacciones enzimáticas de varios biosensores, por lo que el uso de mediadores es una de las alternativas más utilizadas para la disminución del potencial de trabajo. Los biosensores diseñados deben presentar una respuesta rápida y selectiva hacia el analito de interés.

Generalmente, los agentes de reconocimiento se inmovilizan sobre la superficie del electrodo de trabajo por adsorción, polimerización o electrodeposición [29,31]. Una alternativa de inmovilización es la aplicación de mediadores y enzimas disueltos en soluciones de polímeros sintéticos (como Nafión) lo que proporciona varias ventajas como: resistencia al ataque microbiano, una mayor resistencia química y mayor actividad enzimática que cuando se utilizan reacciones de entrecruzamiento [31]. Algunos de los biosensores utilizados en el análisis de oxalato presentan en la Tabla 5.

En los últimos años, varios procedimientos de separación magnéticos han sido desarrollados para aislar y purificar biomoléculas [32]. La utilidad de estas técnicas se basa en la facilidad de recuperación, la velocidad y la especificidad que presentan los materiales modificados hacia una biomolécula aislada de una mezcla compleja.

Tabla 5.- Algunos biosensores reportados para determinar oxalato.

Mediador	E_{detección} (V)	Electrodo de trabajo	pH de Trabajo	LOD	Aplicación	Ref
Cr[Fe(CN) ₆]	-0.05	Grafito	3.8	2.5 μM	Orina	[33]
M[Fe(CN) ₆] (M=Fe, Ni, Ru)	-0.05	Grafito	3.6	19.04 μM	Cerveza	[34]
- -	0.4	Pasta de Carbono	4.5	20 mM	Orina	[35]
- -	0.63	Nanotubos de carbono-Oro	5.0	1.0 μM	Orina	[36]
K ₃ [Fe(CN) ₆]	0.1	Oro	3.6	2.5 μM	Orina	[37]

Esta tecnología ha sido aplicada para la inmovilización del agente de reconocimiento (sobre partículas magnéticas) en la superficie del biosensor. Los compuestos utilizados son convencionalmente óxidos de hierro como la magnetita (Fe_3O_4) y la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) modificados. Las ventajas de este tipo de partículas es que su síntesis es relativamente más sencilla que otros materiales magnéticos, presentan una baja toxicidad, su tamaño de partícula puede ser controlado [38]. Recientemente se han aplicado enzimas y anticuerpos inmovilizados sobre nanopartículas magnéticas recubiertas de sílica en la detección de algunos analitos, empleando una detección electroquímica [39-41].

1.3 Introducción a las técnicas de flujo

Los sistemas de flujo se basan en la inyección de un volumen de muestra a una corriente de líquido en movimiento que contiene los reactivos necesarios para realizar un análisis. Después de un tiempo adecuado, la muestra que ya ha reaccionado con los reactivos, llega al detector donde se registra la señal analítica [42].

Estos métodos presentan diversas ventajas, entre las que destacan: mayor número de análisis por unidad de tiempo, mejor tiempo de respuesta (con frecuencia menos de un minuto entre la inyección de la muestra y la respuesta del detector), menores costos de disolventes, ya que se pierde muy poca cantidad de reactivo (debido al diámetro menor de los tubos) y el equipo es más simple y flexible [43].

El análisis por inyección en flujo (FIA) es un método cuyo sistema, representado en la Figura 6, consta de manera general de una unidad de propulsión que es una bomba peristáltica, un sistema de inyección que consta de una válvula de 4 vías, un sistema de transporte y reacción y un sistema de detección cuya respuesta es proporcional a la concentración inyectada.

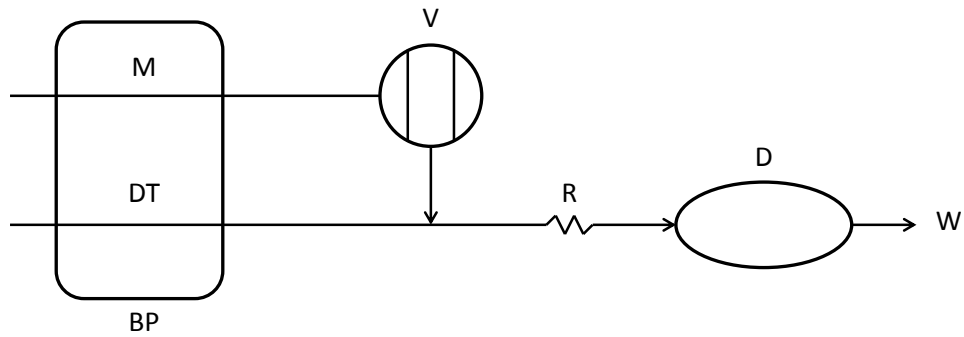


Figura 6. Elementos básicos de un sistema en flujo (BP, bomba peristáltica; M, muestra; DT, solución transportadora; V, válvula de inyección; R, reactor; D, detector; W, desechos)

El presente trabajo describe el desarrollo de un biosensor de ión oxálato basado en el uso de un complejo Fe(II)-bis(2-tiopiridona)borato como mediador y de la aplicación de partículas magnéticas funcionalizadas como soporte para la inmovilización de la enzima OxOx.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- Desarrollar un biosensor amperométrico para la detección de ácido oxálico en orina humana, empleando como mediador un complejo de hierro que contenga como ligante el bis(2-tiopiridona)borato y a la enzima oxalato oxidasa inmovilizada en nanopartículas magnéticas.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar el complejo Fe(II)- bis(2-tiopiridona)borato para su aplicación como mediador en el desarrollo de un biosensor de oxalato.
- Sintetizar y caracterizar soportes magnéticos modificados con grupo amino para su aplicación en la inmovilización de la enzima oxalato oxidasa.
- Integrar el complejo sintetizado y las partículas magnéticas modificadas al desarrollo de un biosensor de oxalato.
- Aplicar el dispositivo diseñado al análisis de muestras de orina humana.

PARTE EXPERIMENTAL



3 PARTE EXPERIMENTAL

Todas las disoluciones fueron preparadas disolviendo el respectivo reactivo de grado analítico en agua desionizada con una conductividad específica menor de $0.1 \mu\text{S cm}^{-1}$.

3.1 Equipos

El sistema de análisis electroquímicos se compuso por 3 elementos principales: el bipotenciostato modelo $\mu\text{STAT 200 DropSens}$ controlado con el software DropView 1.3, un cable conector para electrodos serigrafiados DropSens y el electrodo serigrafiado DropSens 110 modificado.

El análisis de difracción de rayos X en polvos se realizó en un equipo PHILIPS PW1710 equipado con un ánodo de Cu y apertura automática divergente. Las condiciones para el análisis son las siguientes: radiación $\text{CuK}\alpha$ 1.54 \AA , tensión del generador 40 kV; corriente del generador 30 mA; relación de intensidad (α_2/α_1) 0.500, apertura de divergencia 1° apertura receptora 0.1; ángulo inicial ($2\theta^\circ$) 5; ángulo final ($2\theta^\circ$) 70.

Los análisis infrarrojo de transformada con Fourier (FTIR) se realizaron en un equipo Perkin Elmer, modelo IRDM. Las muestras se analizan en pastilla de KBr (1 %).

El análisis morfológico mediante microscopia de barrido electrónico (SEM) del sólido magnético se realizó con un equipo JEOL JSM-820. El análisis cualitativo y la determinación de la distribución de magnetita en los sólidos se hizo con un analizador LINK QX-2000 mediante energía dispersiva de rayos X. Todos los espectros se obtuvieron a 15 kV, a una distancia de 39 mm y 2500 conteos, el ángulo del detector con respecto a la muestra en todos los casos fue de 45° .

El análisis morfológico mediante Microscopia de transmisión electrónica (TEM) se realizó en un microscopio JEOL JEM-101.

3.2 Síntesis de Fe(II)-(bis(2-tiopiridona)borato)

El complejo de Fe(II) se sintetizó mezclando 0.143 g de hidrobis(2-tiopiridona)borato de sodio (Na[Bmp]) y 0.105 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. La mezcla se agita durante 12 horas a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo de reacción la mezcla se filtra, evaporando el disolvente de la fracción soluble. El sólido obtenido se lava con 3 porciones de 10 ml de CHCl_3 , el exceso de disolvente se seca a temperatura ambiente y se pesa (0.073 g, con un rendimiento de 54.9%), reservándolo para la modificación de los electrodos.

El complejo formado se caracterizó mediante espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier, espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) y voltamperometría cíclica (CV).

3.3 Síntesis del soporte enzimático magnético

La síntesis del soporte modificado con OxOx consta de tres etapas. En la primera se sintetiza magnetita (Fe_3O_4) mediante co-precipitación [44]. Se disuelven 3.0 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 80 ml de agua, la mezcla se coloca en agitación constante en un vaso de precipitado mientras se introduce una corriente de aire en la disolución mediante burbujeo y se calienta a 70 °C. Posteriormente se ajusta el pH= 10.0 ± 0.1 con la ayuda de NaOH 6M, el pH se controla y mantiene durante 1 hora.

Transcurrida la reacción se obtiene un precipitado negro con carácter magnético, el cual se separa del medio de reacción por acción de un campo magnético externo. El sólido se lava en tres ocasiones con porciones de agua destilada de 50 ml.

La segunda etapa consiste en el revestimiento del soporte magnético con sílice modificada y grupos amino, para ello se colocan 0.83 g de sólido magnético obtenido en un matraz balón y se le adicionan 0.25 g de tetrametoxisilano, 1.25 g de 3-aminopropiltrietoxisilano y 6.25 ml de una disolución compuesta por Triton X-100 al 2 %, bromuro de cetiltrimetilamonio al 0.2 % y etanol al 25 %. Se adicionan

100 μl de NH_3 concentrado como catalizador a la mezcla y se deja en reflujo durante 16 horas.

Concluido el tiempo de reacción, el sólido magnético separado se lava con agua seguido de etanol. El soporte magnético se seca a 50 °C durante 24 horas, se pulveriza en mortero de agata y se almacena hasta su utilización.

Durante la tercera etapa se inmoviliza la enzima OxOx en el soporte magnético modificado bajo el siguiente protocolo: se toman 50 mg de soporte magnético y se colocan en un vaso de precipitado que contiene 5.0 ml de glutaraldehído al 2.5 %, la mezcla se agita durante 2 horas, transcurrido el tiempo se lava el sólido con agua desoxigenada y posteriormente con disolución de fosfatos (0.1M, pH 7.0) desoxigenada con flujo de N_2 .

El soporte magnético activado se adiciona a 5.0 ml de una disolución de fosfatos desoxigenada que contiene 500 μl de OxOx (7.1 U.Prot./ml) y se coloca en agitación durante 6 horas a 25 °C. El sólido resultante se almacena a 4 °C hasta su utilización.

El sólido magnético fue caracterizado mediante difracción de rayos X de polvos, espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier, microscopía de barrido electrónico y microscopía de transmisión electrónica.

3.4 Modificación de los electrodos de carbono

Los electrodos de carbono serigrafados utilizados para este trabajo son de marca DropSens 110, los cuales están fabricados para análisis electroquímicos empleando microvolúmenes. Las dimensiones de estos electrodos son de 3.4 x 1.0 cm con un espesor de 0.05 cm, el electrodo de trabajo tiene una superficie de 12.5 mm^2 , el electrodo auxiliar y de referencia son de carbono y Ag/AgCl, respectivamente.

Una disolución con 2.5 mg del complejo de Fe(II)-(bis(2-tiopiridona)borato) se disuelve en 0.5 ml de acetonitrilo. Se toman 20 μl de esta solución y se mezclan con 20 μl de nafion (5% p/v disuelta en alcoholes de bajo peso molecular). Se colocan 5 μl de la mezcla en la superficie del electrodo de trabajo, evaporando el solvente mediante una corriente de aire durante algunos segundos.

3.5 Construcción del Biosensor

El sistema de análisis se compone por 3 elementos principales: el bipotenciostato modelo μSTAT 200 DropSens controlado con el software DropView 1.3, un cable conector para electrodos serigrafiados DropSens y el electrodo serigrafiado DropSens 110 modificado con el complejo Fe(II)-(bis(2-tiopiridona)borato).

El paso siguiente es la inmovilización del soporte magnético sobre el electrodo de trabajo, esto se hace dispersando el sólido magnético modificado con enzima en 5 ml de solución tampón de fosfatos (0.1 M pH 7.0). Posteriormente se colocan 20 μl de esta solución con la enzima inmovilizada OxOx sobre la superficie del electrodo de trabajo, y se retiene por acción de un campo magnético externo colocado en la parte trasera del electrodo.

El biosensor se acondiciona mediante voltamperometría cíclica, realizando 10 ciclos de activación en una ventana electroquímica de -0.7 a 0.7 V a una velocidad de barrido de 25 mV s^{-1} en una solución tampón de acetatos (0.1 M, pH 4.0).

3.6 Análisis de muestras

Posteriormente se realizan los análisis de muestras de orina mediante cronoamperometría a un potencial de -0.2 V, registrando la señal cada segundo. En la Figura 7 se muestra la forma de análisis de las muestras. Las muestras de orina se prepararon mezclando 0.5 ml de orina y 0.5 ml de solución tampón de acetatos (0.1 M, pH 4.0). La cuantificación se realiza mediante el método de adiciones estándar, añadiendo a la muestra preparada soluciones de ácido oxálico de 10.0, 20.0 y 30.0 mg l^{-1} .

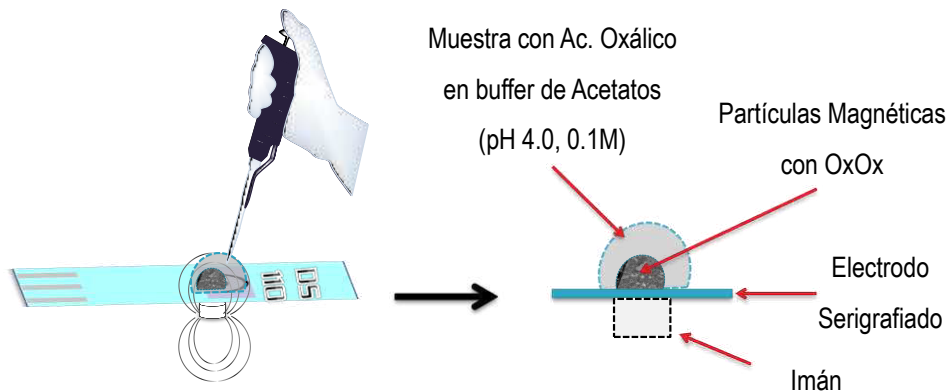


Figura 7. Análisis de muestras de ácido oxálico.

3.7 Análisis por Inyección en Flujo

Sobre la superficie del electrodo de trabajo modificado con Fe(II)-Bmp se adicionan 10 μl de solución enzimática (descrita en el apartado 3.3). Para llevar a cabo la determinación amperométrica de ácido oxálico se diseñó un sistema FIA de un solo canal (Figura 8). El sistema de análisis optimizado comienza con la inyección de una alícuota de 100.0 μl de muestra en el canal DT donde fluye la disolución transportadora a 0.75 ml min^{-1} (solución tampón de acetatos, 0.1 M, pH 4.0). La muestra se acondiciona en el reactor R (60.0 cm) y se detecta amperométricamente a un potencial de -0.2 V (vs Ag/AgCl). A este potencial se determina el peróxido de hidrógeno formado durante la reacción enzimática.

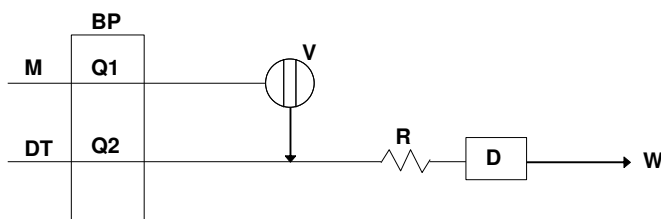


Figura 8. Esquema del montaje FIA utilizado en la determinación de ácido oxálico.

BP, bomba peristáltica; Q, caudal; M, muestra; DT, disolución transportadora; V, válvula de inyección; R, reactor; D, detector; W, desecho.

RESULTADOS Y DISCUSIONES



4 RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Caracterización del Complejo Fe(II)-(bis(2-tiopiridona)borato)

4.1.1 Infrarrojo

En el análisis mediante espectroscopía de infrarrojo del complejo de hierro empleado como mediador mostró una banda ancha alrededor de 3400 cm^{-1} debida a las moléculas de agua coordinadas al metal, se puede observar también una banda a 2990 cm^{-1} correspondientes al enlaces C-H del anillo piridínico, la banda en 2310 cm^{-1} se atribuye a la vibración del enlace B-H del ligante (Bmp), en 1641 cm^{-1} se encuentra una de las bandas características que indican presencia de agua, la banda en 1380 cm^{-1} corresponde al enlace C=C presente en la tiopiridona del ligando y por último en 695 cm^{-1} se observa una banda atribuida al enlace S-S existente en dímero formado en la reacción de formación del complejo. [45] (Figura 9).

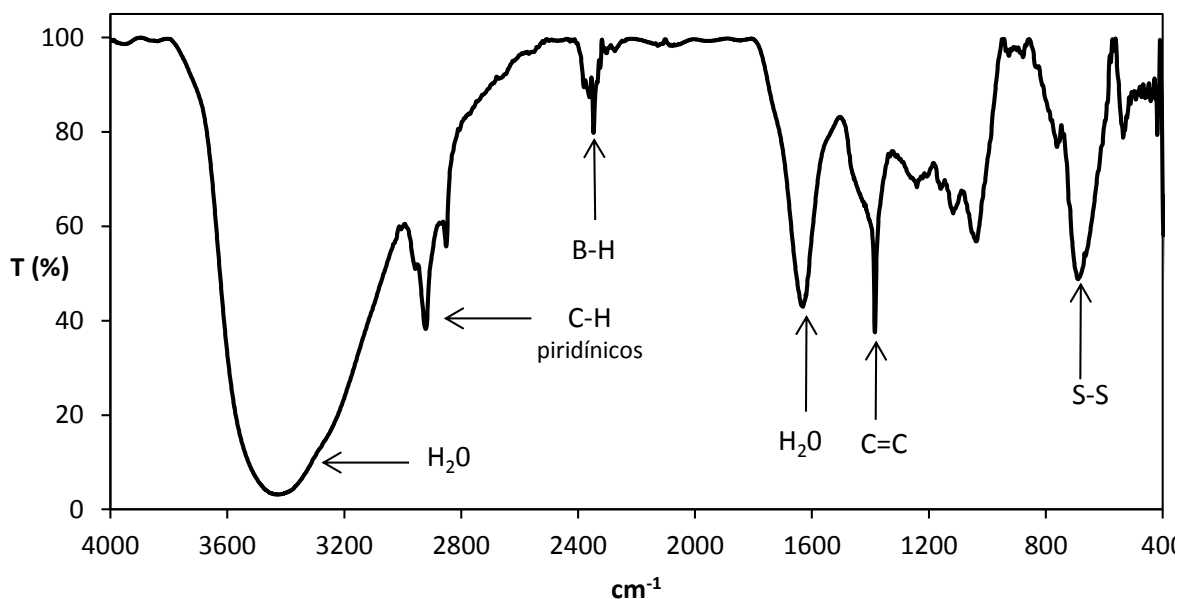


Figura 9. Espectro Infrarrojo del complejo Fe(II)-(bis(2-tiopiridona)borato).

4.1.2 Espectrometría de masas de alta resolución

La caracterización por espectrometría de masas de alta resolución para el complejo metálico (Fig. 10), mostró señales para dos iones derivados del compuesto. Uno con una relación m/z de 343.0539 una correspondiente al ión del complejo metálico $[\text{Fe}\{\text{H}_2\text{B}(\text{mp})_2\}(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ y otra señal a 220.0208 una correspondiente a un compuesto 2,2-dipiridil disulfuro ($\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{S}_2$) obtenido como subproducto de síntesis. Con base a los resultados obtenidos se propone el esquema de síntesis del complejo en dos etapas (Fig. 11), la primera incluye la reducción de Fe(III) a Fe(II) y la segunda la formación del complejo metálico $[\text{Fe}\{\text{H}_2\text{B}(\text{mp})_2\}(\text{H}_2\text{O})_3]^+$.

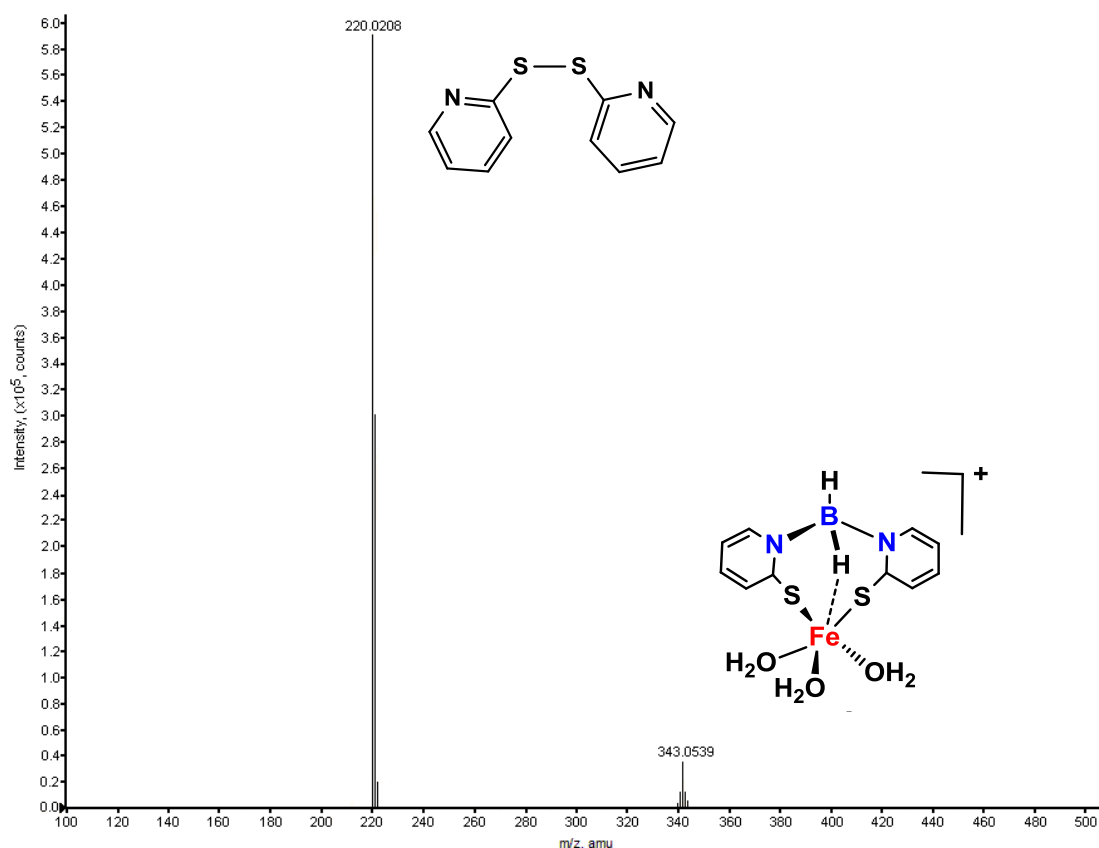


Figura 10. Espectrometría de masas de alta resolución del complejo metálico.

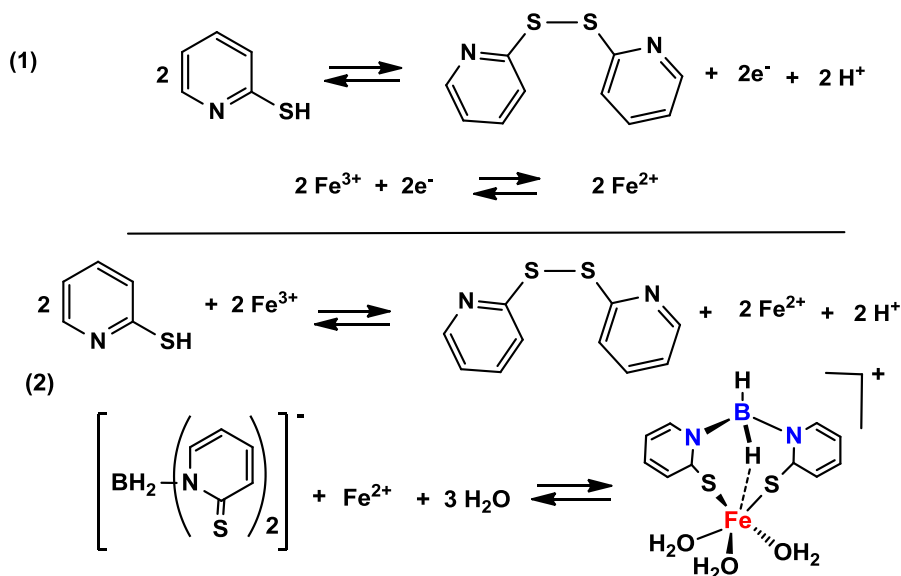


Figura 11. (1) Reducción del Fe(III) a Fe(II). (2) Formación del complejo $[\text{Fe}\{\text{H}_2\text{B}(\text{mp})_2\}(\text{H}_2\text{O})_3]^+$.

De acuerdo con los compuestos observados mediante la espectrometría de masas de alta resolución, podemos asegurar la presencia de un dímero que se obtuvo a partir de mercaptopiridina libre que fue utilizada como materia prima en la síntesis del ligante, este compuesto contribuye a la reducción del Fe^{3+} , llegando a la formación del dímero. Para confirmar la existencia de este compuesto se logró obtener cristales óptimos para difracción de Rayos X, presentada en la Figura 12.

El compuesto de mayor peso molecular coincide con el producto de la síntesis propuesta que además de estar coordinado con el ligante mercaptopiridínico, tiene ligantes aquo que ayudan a mantener una geometría octaédrica con el centro metálico.

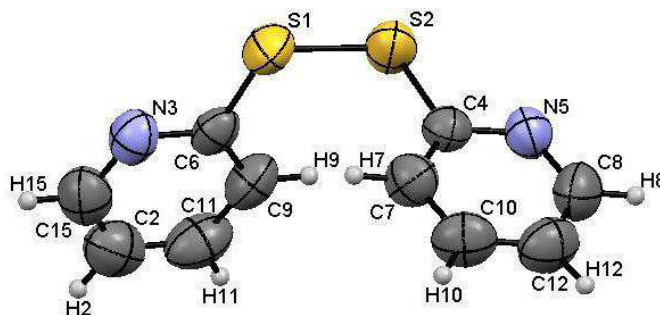


Figura 12. Difractograma de rayos X de monocristal del dímero $C_{10}H_8N_2S_2$.

La caracterización estructural del dímero forma se realizó mediante difracción de rayos X de monocristal, utilizando cristales adecuados para determinar la estructura teórica del compuesto. El compuesto formado consta de dos mercaptopiridinas unidas entre sí por el átomo de azufre con distancia de enlace S_1-S_2 de 2.0230(3) Å y conformación cis con respecto a los anillos piridínicos unidos a este enlace. Las distancias de enlace correspondientes a los carbonos que forman los anillos piridínicos se encuentran entre 1.3527(3) a 1.3841(3) Å, lo que nos indica la presencia de aromaticidad para estos anillos.

Tabla 6. Parámetros geométricos del dímero

a. Distancias de enlace característicos			
S_1-S_2	2.0230(3)	C_4-C_7	1.377(1)
S_1-C_6	1.7896(3)	C_8-C_{12}	1.364(1)
S_2-C_4	1.790(1)	C_9-C_{11}	1.3841(3)
N_3-C_6	1.3285(2)	$C_{12}-C_{10}$	1.3652(2)
b. Ángulos de enlace			
$S_2-S_1-C_6$	105.47	$N_5-C_8-C_{12}$	123.17
$S_2-C_4-N_5$	110.32	$C_9-C_{11}-C_2$	119.89
$S_2-C_4-C_7$	125.66	$C_8-C_{12}-C_{10}$	118.97
$N_3-C_6-C_9$	123.78	$C_{11}-C_2-C_{15}$	118.36
$C_4-C_7-C_{10}$	117.67	$C_7-C_{10}-C_{12}$	119.34

4.1.3 Voltamperometría cíclica

El comportamiento electroquímico y posible aplicación como mediador de H_2O_2 del Fe(II) -(bis(2-tiopiridona)borato) se evaluó mediante voltamperometría cíclica utilizando el electrodo modificado. En la Figura 13 se muestra los voltamperogramas obtenidos en tampón de acetatos (0.1 M, pH 4.0) en ausencia y presencia de H_2O_2 en una ventana electroquímica de -0.7 a 0.7 V a una velocidad de barrido de 25 mV s^{-1} .

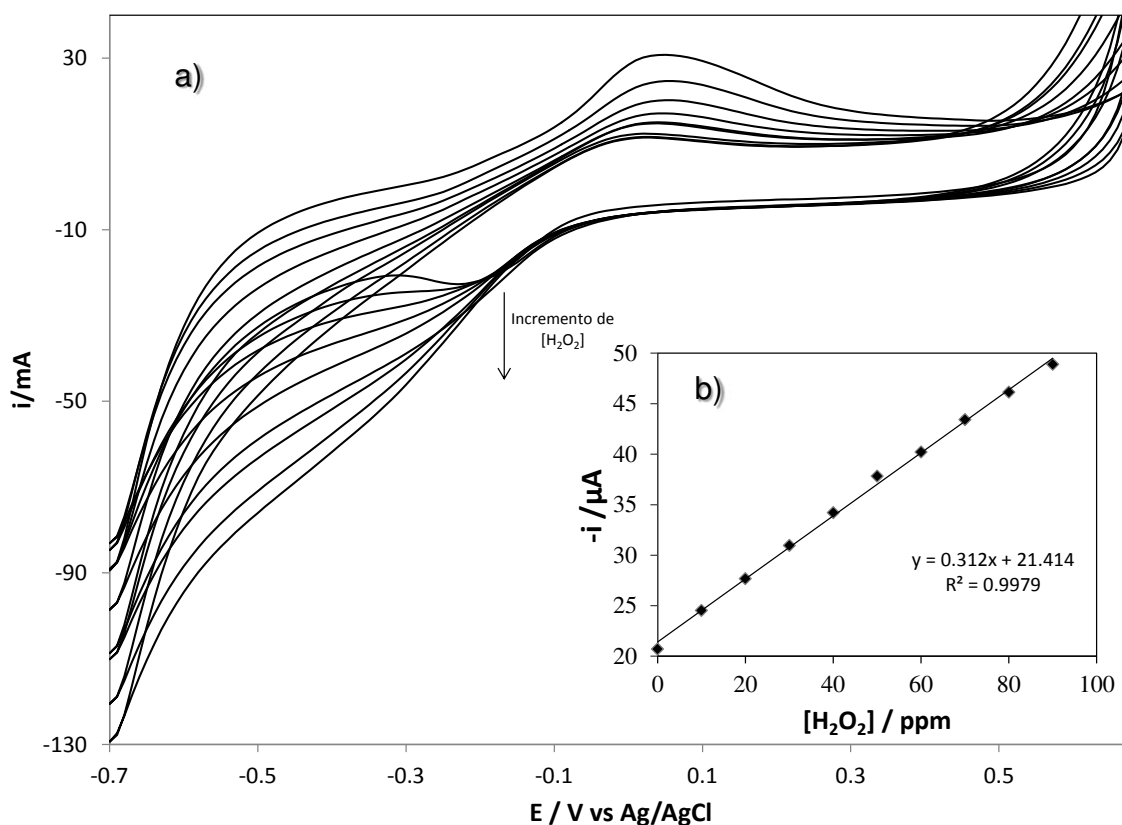
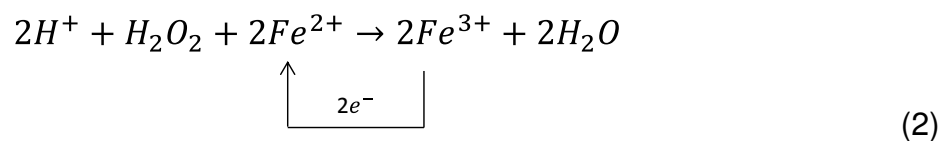


Figura 13. a) Voltamperograma del electrodo modificado con Fe(III) -(tris(2-tiopiridona)borato) en ausencia y presencia de H_2O_2 . b) Curva de calibración – Intensidad del pico catódico (μA) vs $[(\text{COOH})_2]$ (mg l^{-1})

El voltamperograma muestra un pico anódico aproximadamente a 0.04 V y un pico catódico en -0.23 V correspondiente a la oxidación y reducción del hierro contenido en el complejo. Adicionalmente se observa un incremento en las respuesta anódicas y catódicas cuando se realizan adiciones de H₂O₂, lo que demuestra que existencia de la siguiente reacción electrocatalítica (2) y una posible aplicación como mediador en la determinación de ácido oxálico por medio de un método enzimático.



4.2 Caracterización del soporte magnético

4.2.1 Infrarrojo

La Figura 14 muestra los espectros de infrarrojo para las tres etapas de inmovilización de la enzima sobre las nanopartículas. El análisis de los espectros para la magnetita (Fig.14.a) muestra una banda a 583 cm^{-1} atribuida a la vibración del enlace Fe-O de la magnetita y una banda ensanchada a 3500 cm^{-1} correspondiente a la humedad remanente en el sólido. En el espectro de la magnetita recubierta con sílice y grupos amino (Fig.14.b) presenta una banda a 3148 cm^{-1} atribuida a los grupos Si-OH y $-\text{NH}_2$ y otra banda a 1074 cm^{-1} atribuida a la vibración Si-O-Si de la magnetita recubierta con grupos funcionales. El espectro del sólido modificado con la enzima OxOx (Fig.14.c) mostró a 2926 cm^{-1} una banda correspondiente a la vibración C-H y otra a 1644 cm^{-1} debida a una vibración de C=O [44], esto por la presencia de aminoácidos de la enzima inmovilizada.

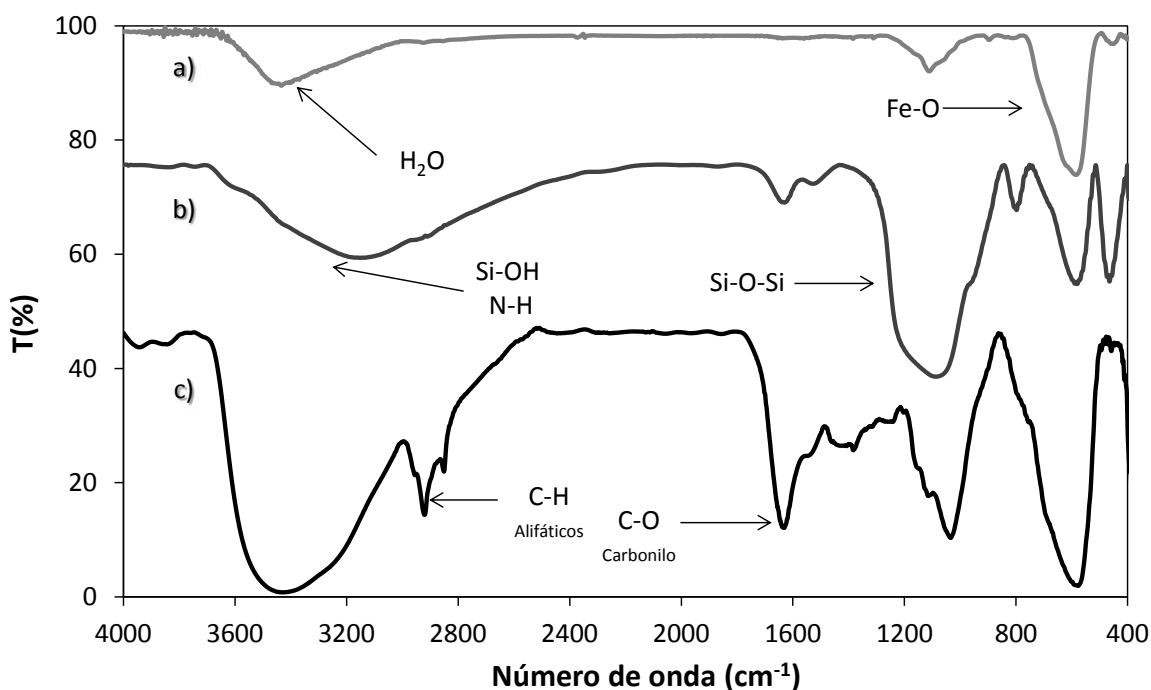


Figura 14. Espectro FTIR del soporte magnético enzimático. a) magnetita, b) magnetita cubierta con silica gel y c) soporte magnético con la enzima inmovilizada.

4.2.2 Difracción de rayos X de polvo

Con la finalidad de identificar la fase de hierro presente en el sólido se realizó el estudio de difracción de rayos X en polvos. El difractograma obtenido se muestra en la Figura 15. Presenta seis líneas de difracción (m) en ángulos 2θ de 30.1° , 35.5° , 43.1° , 53.4° , 57.0° y 62.6° , las cuales son características para la (Fe_3O_4) magnetita [42]. Adicionalmente se observan señales anchas alrededor de $15\text{-}25^\circ$ 2θ que corresponden a la parte amorfa del sólido (SiO_2).

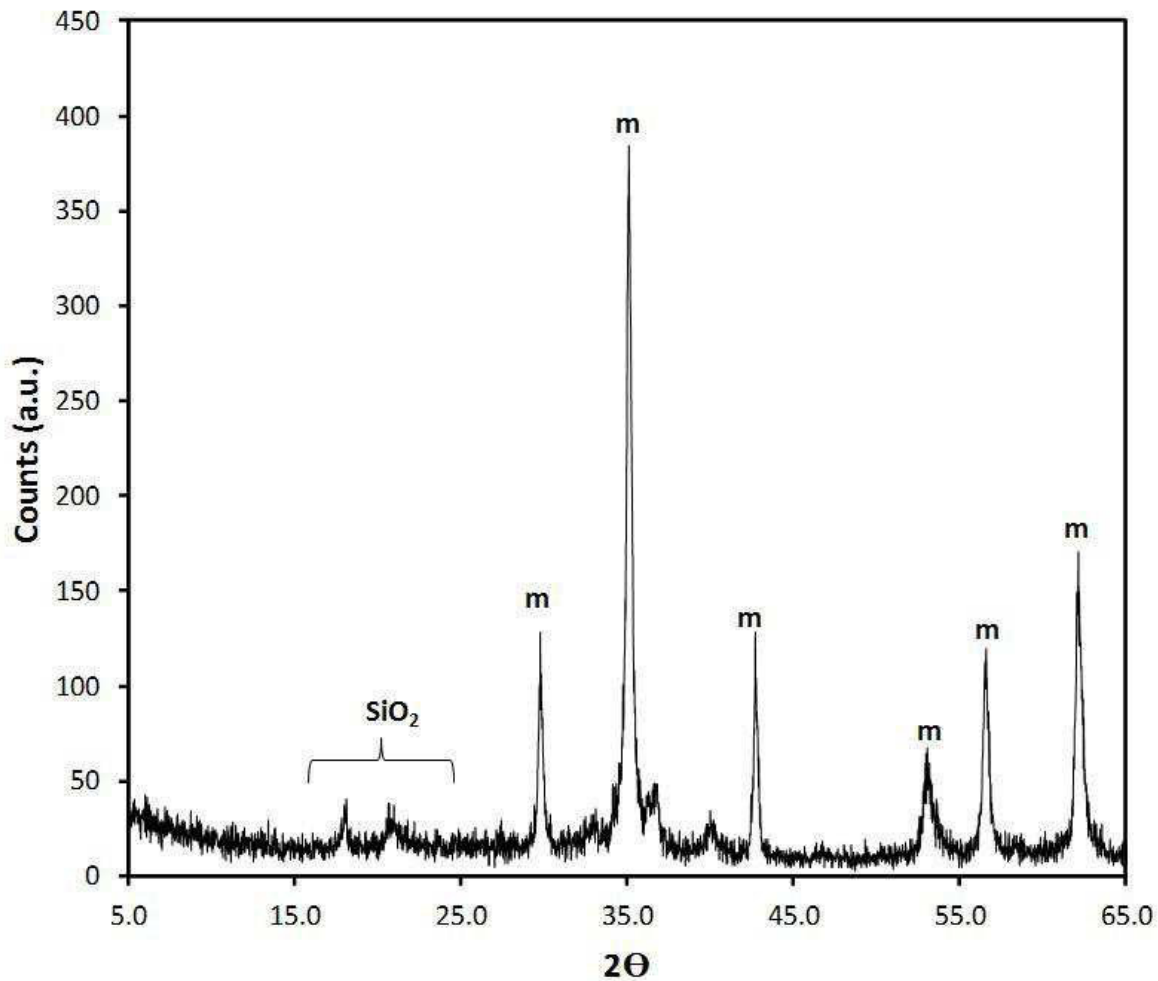


Figura 15. Patrones de difracción para el soporte magnético. (m: líneas de difracción características para magnetita).

4.2.3 Microscopía electrónica

La morfología de las nanopartículas que componen al soporte magnético se analizó mediante las micrografías obtenidas por SEM y TEM Figura 16 (a) y (b), respectivamente.

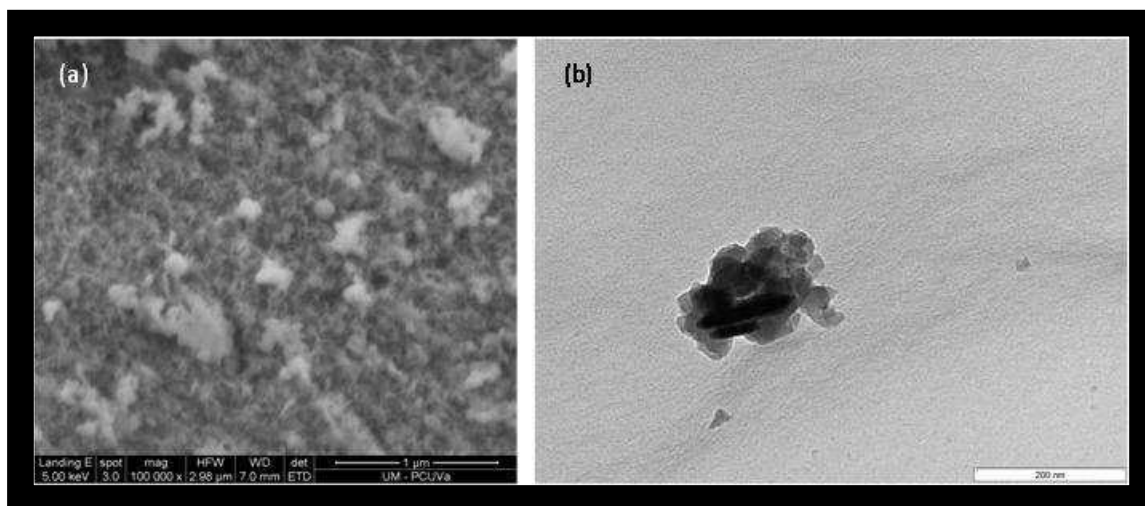


Figura 16. (a) Micrografía (SEM) del soporte magnético. (b) Micrografía (TEM) del soporte magnético.

El análisis por microscopía electrónica de barrido (Fig.16.a) muestra que el sólido está constituido por partículas que van de entre los 50 a los 180 nm. Mediante microscopía de transmisión electrónica se confirmó la formación de partículas multinucleos (Fig. 16.b), en la que se pueden observar núcleos oscuros correspondientes a la magnetita y núcleos claros que corresponden al recubrimiento con sílica modificada con grupos amino.

Esta morfología en el sólido magnético favorece su aplicación en este tipo de análisis enzimáticos, esto debido a que tienen una mayor retención del agente de reconocimiento, poseen una mayor superficie de contacto lo que aumenta la sensibilidad, no forma agregados y tienen una mayor dispersión [46].

4.3 Optimización del sistema de análisis en discontinuo

4.3.1 Optimización del pH

Una vez caracterizadas las partes componentes del biosensor, se procede a realizar la optimización de las condiciones de análisis. Una vez determinada la actividad electrocatalítica, se evaluó el efecto del pH sobre la señal analítica, en el intervalo de 2 a 10 (ajustados con tampón Britton-Robinson) mediante voltamperometría cíclica. Para ello se evalúa el efecto sobre la intensidad del pico catódico utilizando una concentración de H_2O_2 de 200 mg l^{-1} . La intensidad de la señal es máxima en valores de pH entre 4.0 y 5.0 (Figura 17), observándose una disminución a valores de pH mayores a 5.0, por lo que se optó por emplear tampón de acetatos 0.1 M, pH 4.0 para las determinaciones consecuentes, este valor de pH concuerda con el valor ideal para la actividad de la enzima.

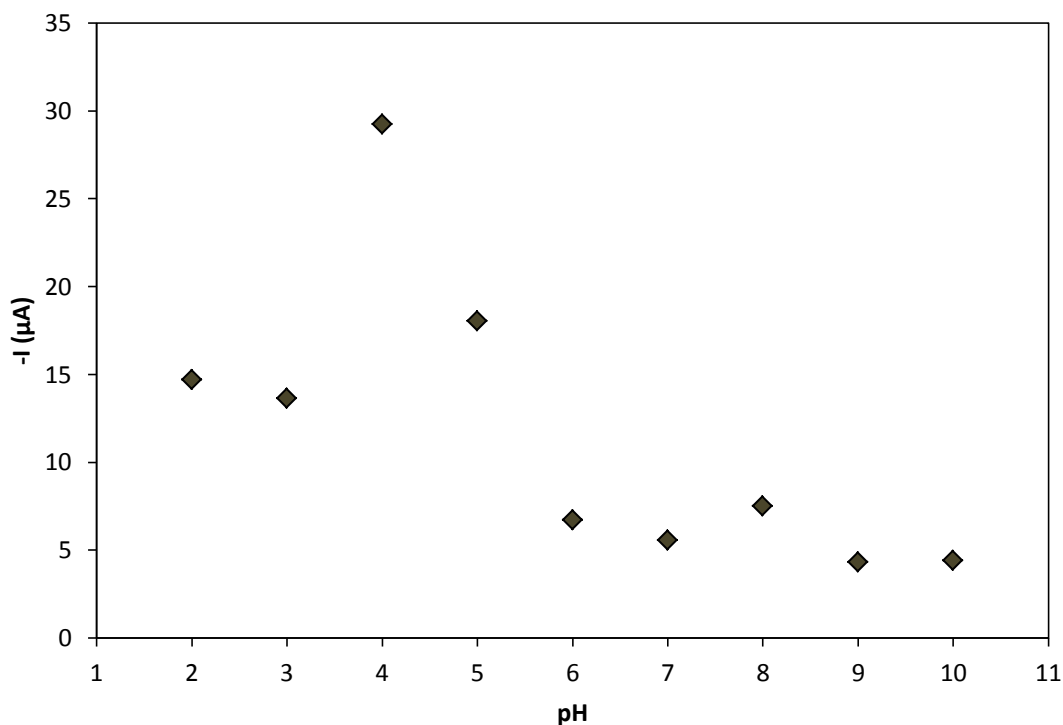


Figura 17. Intensidad de la señal para el pico catódico en voltamperometría cíclica evaluado a diferentes valores de pH.

4.3.2 Optimización del potencial

Posteriormente se evaluó la respuesta amperométrica del sensor de H_2O_2 a diferentes potenciales de detección (0.0, -0.1 y -0.2 V) mediante cronoamperometría. La sensibilidad analítica (mA l mg^{-1}) aumenta cuando el potencial aplicado disminuye hasta valores de -0.2 V (Figura 18), por lo que se eligió éste último potencial para minimizar posibles interferencias.

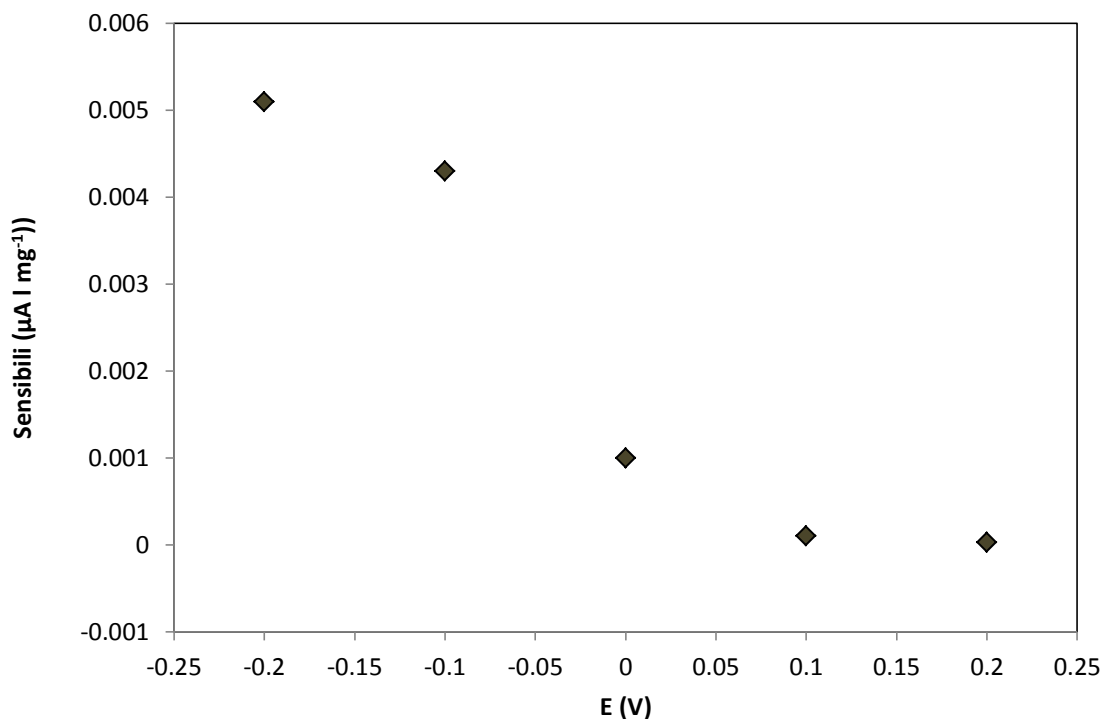


Figura 18. Sensibilidad analítica (mA l mg^{-1}) de la señal con el incremento de la $[\text{H}_2\text{O}_2]$ en cronoamperometría evaluada a diferentes valores de potencial.

4.3.3 Cronoamperometría

Una vez evaluadas las condiciones más adecuadas para la determinación de H_2O_2 , se concluyó la construcción del biosensor adicionando en la superficie del electrodo $20\ \mu\text{l}$ de la suspensión que contiene las nanopartículas magnéticas modificadas con OxOx. La Figura 19, muestra la respuesta cronoamperométrica obtenida a diferentes concentraciones de ácido oxálico a pH 4.0, aplicando un potencial de detección de $-0.2\ \text{V}$.

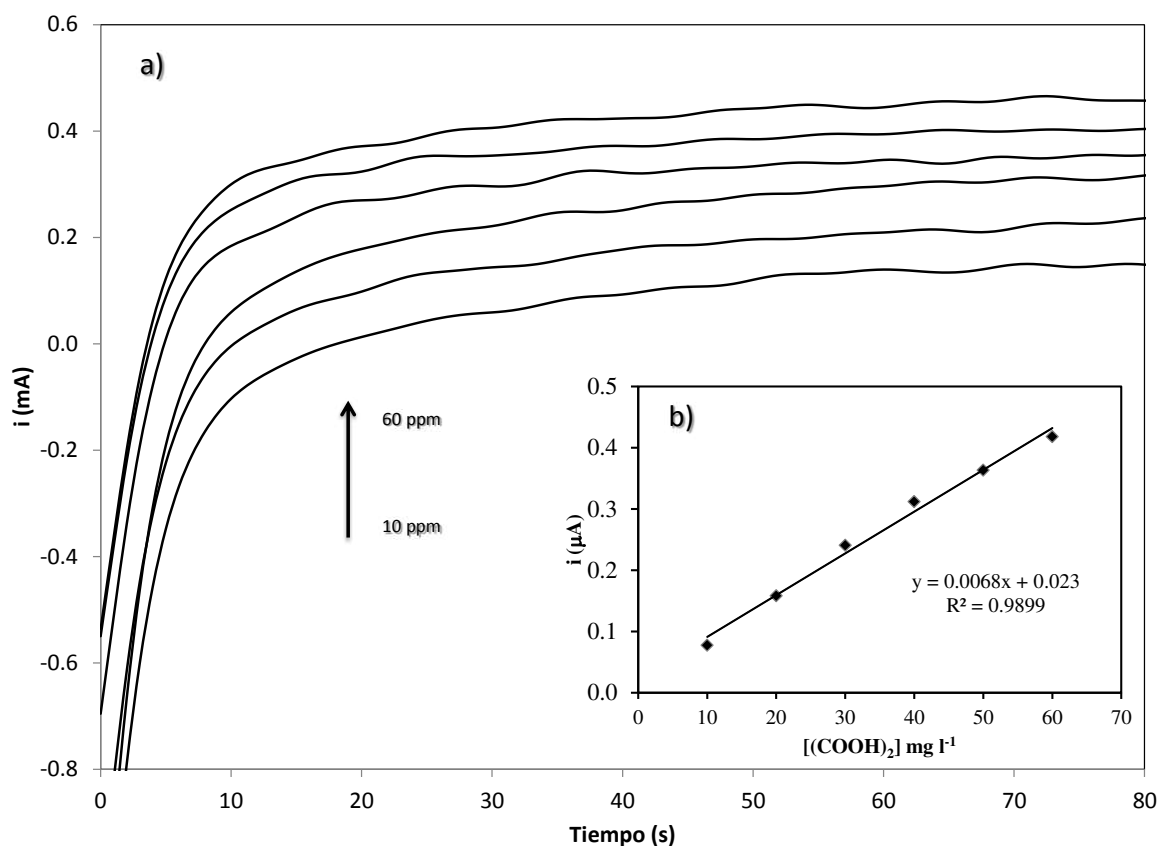


Figura 19. a) Cronoamperometría obtenida del análisis del ácido oxálico utilizando el biosensor propuesto. b) Curva de calibración de ácido oxálico a un $t = 60\ \text{s}$.

Bajo las condiciones descritas se realizaron las líneas de calibrado utilizando soluciones estándar en el intervalo de concentraciones entre 10 y $60\ \text{mg l}^{-1}$ de ácido oxálico. La altura de la señal obtenida (μA) se midió por triplicado, construyéndose las líneas de calibrado a partir de las alturas medias. Las líneas de calibrado muestran una dependencia lineal entre la intensidad de la señal y la

concentración de ácido oxálico en la solución estándar. Los parámetros de regresión de las líneas de calibrado se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Parámetros de regresión de las líneas de calibrado para [(COOH)₂].

Parámetro	Valor
Coefficiente de correlación r^2	0.990
Ordenada en el origen. b_0 (μA)	-0.013 \pm 0.026
Sensibilidad analítica. b_1 ($\mu\text{A l mg}^{-1}$)	0.007 \pm 0.001
Intervalo lineal (mg l^{-1})	3.6-60.0
Límite de detección (mg l^{-1})	1.2

Los parámetros obtenidos permiten analizar ácido oxálico en orina en las concentraciones consideradas como normales para un individuo sano o con trastornos renales ocasionados por la presencia del mismo.

Se analizaron posibles respuestas para compuestos que pudieran interferir en el análisis empleando soluciones que contenían el analito y los posibles interferentes como el ácido úrico, ácido ascórbico, acetaminofén y ácido acetilsalicílico. La respuesta del electrodo en la detección amperométrica empleando concentraciones de los interferentes que van de 20 a 100 mg l^{-1} no mostró un cambio en las señales con respecto a la observada en el caso del ácido oxálico, lo que permite descartar posibles interferencias y genera un biosensor selectivo.

La metodología propuesta se aplicó al análisis de muestras de orina perteneciente a 3 diferentes grupos de personas: a) adultos mayores, b) adultos y c) niños, colectándose 3 muestras de cada género. Cada una de las muestras se analizó por triplicado utilizando la técnica de adición patrón. Los intervalos de concentración de ácido oxálico encontrados se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Intervalos de concentración encontrados en muestras de orina.

Grupo de Edad	Sexo	Concentración de oxalato (mg/l)
<u>Niños</u> (2 a 13 años)	Hombre	13.7 - 40.0
	Mujer	5.8 - 29.3
<u>Adultos</u> (18 a 40 años)	Hombre	16.8 - 29.2
	Mujer	20.2 - 22.6
<u>Adultos Mayores</u> (50 años en adelante)	Hombre	11.4 - 38.8
	Mujer	12.8 - 20.7

4.4 Optimización del sistema de análisis en flujo (FIA)

Existen variables en la determinación de ácido oxálico presente en la orina para un sistema de análisis en flujo que pueden ser evaluadas para permitir una mayor eficiencia en los experimentos. Para esto se utilizó un diseño de parámetros Taguchi (TPD) que proporciona la información necesaria para optimizar estas variables utilizando un mínimo de experiencias. El TPD emplea una serie de matrices de diseño (arreglos ortogonales), en las cuales las columnas (factores e interacciones) y las filas (experiencias) son colocadas de manera adecuada para indicar una combinación de factores y niveles de cada experimento, permitiendo así la evaluación de distintos parámetros con sólo un mínimo de experiencias.

Hay 5 pasos involucrados en la optimización de sistemas mediante TPD:

- 1) La elección de la variable de salida a optimizar
- 2) La identificación y selección de los factores que afectan al sistema.
- 3) La elección del arreglo ortogonal adecuado y de los niveles de los factores.
- 4) El análisis de los resultados para encontrar los valores óptimos.
- 5) La confirmación del valor óptimo mediante la realización de la curva de calibración en las condiciones óptimas predichas.

Se seleccionó a la intensidad de la señal en la detección amperométrica del oxalato como factor objetivo, el cual se desea que obtenga un valor máximo relacionado con la obtención de parámetros analíticos adecuados.

El análisis en flujo del oxalato en orina tiene 4 principales variables de control:

- El volumen de inyección.
- La velocidad de flujo.
- La longitud del reactor.
- Cantidad de enzima empleada en el análisis.

El volumen de inyección es factor a controlar debido a que se relaciona con los procesos de difusión y la velocidad de la reacción enzimática. Con la velocidad de

flujo se puede analizar la cinética enzimática que sucede durante el transporte del analito por el detector. La longitud del reactor es optimizable debido a que está relacionado con la velocidad de la reacción enzimática, una longitud adecuada permite un tiempo apropiado para que se efectúe la reacción enzimática y finalmente la cantidad de enzima empleada en el análisis puede intervenir en la magnitud de peróxido generado y por tanto detectado por el electrodo.

El arreglo ortogonal que permite el análisis de 4 factores es el $L_9 (3^4)$, en el que se involucran 3 niveles para cada uno de ellos que fueron elegidos mediante experimentos previos. Los valores seleccionados para los distintos factores se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Factores y niveles seleccionados para la optimización.

Factor	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Notación
Volumen de inyección (μl)	50	100	150	V.I.
Velocidad de Flujo ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)	0.50	0.75	1.00	V.F.
Longitud del reactor (cm)	30	60	80	L.R.
Cantidad de soporte enzimático (μl)	10	20	30	[Enz]

La matriz de diseño y los resultados obtenidos se muestra en la Tabla 10. Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado para calcular un valor promedio, de modo que se realizaron 27 experimentos. Para el proceso de optimización se usó una solución de ácido oxálico de 50 mg l^{-1} en solución tampón de acetatos (0.1M, pH 4.0).

Tabla 10. Matriz de diseño ortogonal L_9 (3^4) utilizada para la optimización de los parámetros analíticos que intervienen en la determinación amperométrica enzimática del ion oxalato.

Experimento	Control de factores y niveles				Señal promedio (μA)
	V.I.	V.F.	L.R.	[Enz]	
1	1	1	1	1	0.024
2	1	2	2	2	0.012
3	1	3	3	3	0.009
4	2	1	2	3	0.008
5	2	2	3	1	0.036
6	2	3	1	2	0.018
7	3	1	3	2	0.012
8	3	2	1	3	0.014
9	3	3	2	1	0.038

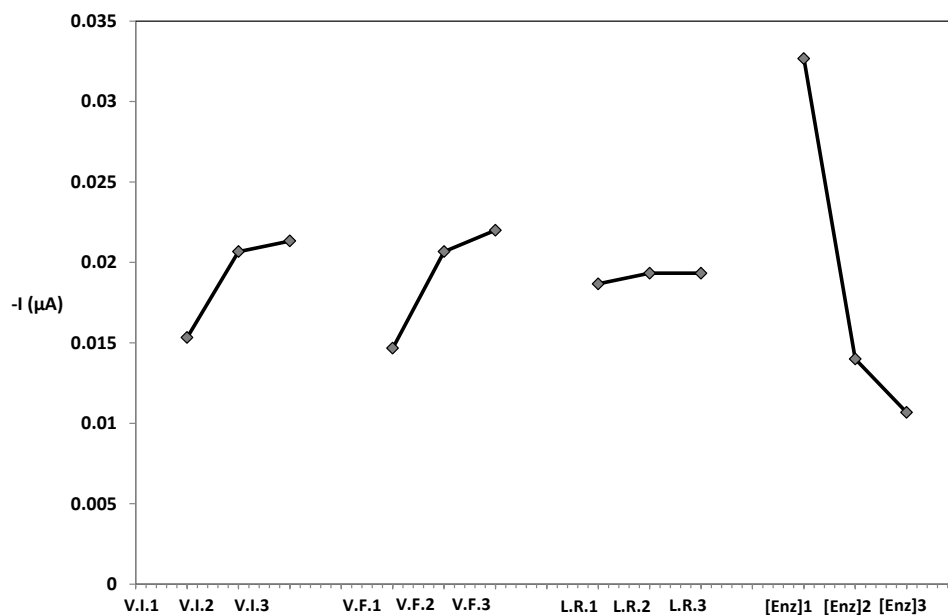


Figura 20. Efecto de la interacción de factores control en los valores de V.I., V.F., L.R. y [Enz].

En la Figura 20 se muestran los niveles óptimos encontrados, los cuales son: 150 μl de volumen de inyección, una velocidad de flujo de $1.00 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, una longitud de reactor de 60 cm y 10 μl de solución con el soporte enzimático. El volumen de inyección se relaciona con la cantidad de analito que reacciona, siendo el valor mayor el que mejora la detección del mismo. La velocidad de flujo óptima en nivel alto está ligada a fenómenos difusionales, a caudales de trabajo bajos la señal mostraba un aumento en el área bajo la curva mientras que la intensidad de pico disminuía. La longitud del reactor no afecta de manera significativa al análisis y por tanto se eligió la longitud intermedia; finalmente se seleccionó el espesor de soporte magnético menor ya que así se favorece el transporte del peróxido formado hacia el electrodo.

A partir de las condiciones óptimas encontradas se realizó la línea de calibrado utilizando soluciones estándar de ácido oxálico de concentraciones entre 100 y 400 mg l^{-1} , estas soluciones fueron analizadas a través del sistema FIA optimizado. La adición de las diferentes concentraciones se realizó por triplicado, obteniendo así la altura promedio de las señales para construir la línea de calibrado. Esta línea muestra una relación proporcional entre la concentración del analito con la intensidad media de la señal. El FIAGrama obtenido y los parámetros de regresión de línea de calibrado se muestra en la Figura 21 y la Tabla 11, respectivamente.

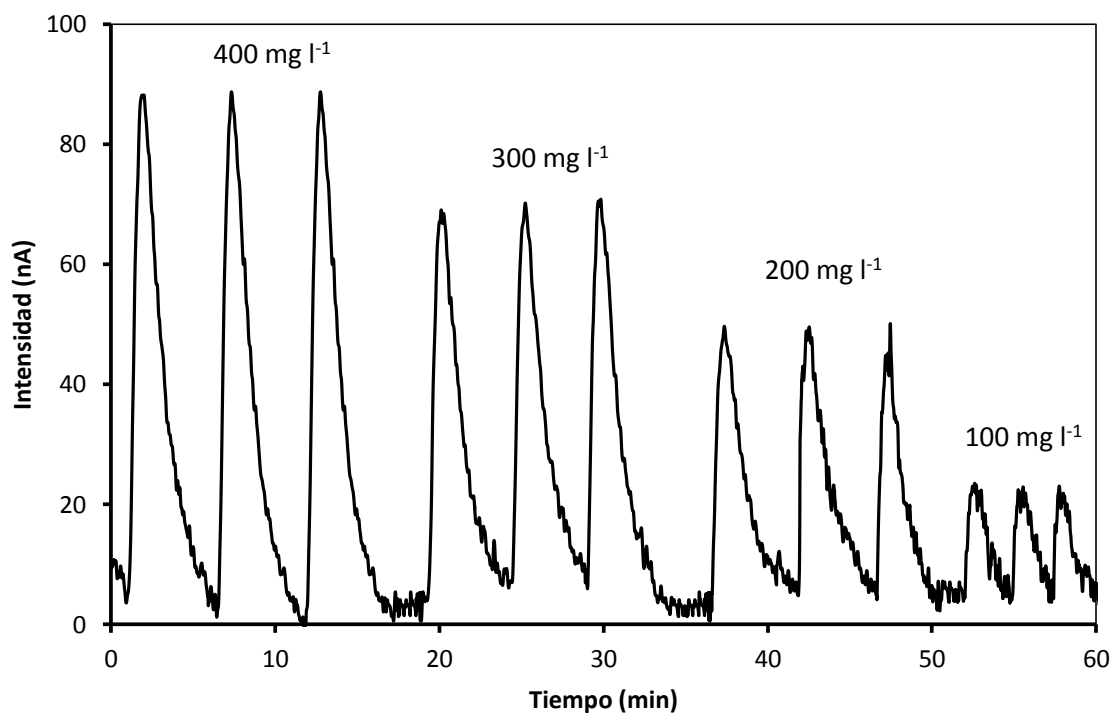


Figura 21. FIograma de la inyección de soluciones estándar de ácido oxálico en solución tampón de acetatos (pH 4.0, 0.1 M).

Tabla 11. Parámetros de regresión de la línea de calibrado, altura (nA) vd concentración de ácido oxálico (mg l^{-1}).

Parámetro	Valor
Coefficiente de correlación r^2	0.998
Ordenada en el origen, (nA)	5.430 ± 23.351
Sensibilidad analítica. (nA l mg^{-1})	0.204 ± 0.878
Repetitividad (%DSR, $n=3$, 400 mg ql^{-1})	0.605
Intervalo lineal (mg l^{-1})	75 - 400
Límite de detección (mg l^{-1})	25
Velocidad de análisis (muestras h^{-1})	12

Desafortunadamente el análisis FIA para la determinación de ácido oxálico resultó inaplicable para muestras de orina ya que el intervalo lineal de trabajo no es adecuado. La sensibilidad del método FIA es menor que el sistema en discontinuo, por lo que se puede concluir que el sistema en continuo no permite alcanzar el equilibrio durante la determinación.

CONCLUSIONES



5 CONCLUSIONES

- Se desarrolló un biosensor de ácido oxálico empleando como mediador el compuesto de Fe(II)-Bis(2-tiopiridona)borato, el cual mostró un buen comportamiento electroquímico en presencia de H_2O_2 .
- La inmovilización de la enzima OxOx sobre nano partículas magnéticas funcionalizadas, es una opción viable para conservar la actividad enzimática.
- El biosensor diseñado es selectivo ya que no presenta interferencia a moléculas comúnmente encontradas en orina como ácido úrico, ácido ascórbico, acetaminofén y ácido salicílico.
- El biosensor propuesto es una alternativa debido a que es un instrumento útil, específico, económico y con buena sensibilidad para la determinación de ácido oxálico en muestras de orina humana.

REFERENCIAS



6 REFERENCIAS

- [1] Broe, M. E.; Porter, G. A. (Ed.). (2008). Clinical Nephrotoxins. 3ra ed., 749-754.
- [2] Ringbom, A. Formación de complejos en química analítica. (1979). Alhambra. 346.
- [3] Streit, J.; Tran-Ho, L. C.; Königsberger, E. (2008). Solubility of the three calcium oxalate hydrates in sodium chloride solutions and urine-like liquors. Monatshefte Für Chemie. 129, 1225-36.
- [4] Grases, F.; Conte, A.; Costa-Bauzá, A. (2001). "Tipos de cálculos renales. Relación con la bioquímica urinaria". Archivos Españoles de Urología. 54, 861.
- [5] Wandzilak, T. R.; Williams, H. E. (1990). The hyperoxaluric syndromes. Endocrinol. Metabolism Clinics of North America. 19, 851.
- [6] Pundir, C. S.; Sharma, M. (2010). Oxalate biosensor: a review. Journal of Scientific & Industrial Research. 69, 489-494.
- [7] Hatch, M.; Freel, R. W.; Vaziri, N. D. (1994). Intestinal excretion of oxalate in chronic renal failure. Journal of the American Society of Nephrology. 5, 1339-1343.
- [8] Hatch, M.; Cornelius, J. G.; Allison, M.; Sidhu, H.; Peck, A. B.; Freel, R. W. (2006). Oxalobacter sp. reduces urinary oxalate excretion by promoting enteric oxalate secretion. Kidney International. 69, 691-698.
- [9] Argeri, N.; Lopardo, H. (1993). Análisis de orina. Editorial panamericana. 133.
- [10] Baggio, B.; Gambaro, G.; Ossi, E.; Favaro, S.; Borsatti, A. (1983). Increased urinary excretion of renal enzymes in idiopathic calcium oxalate nephrolithiasis. Journal of Urology. 129(6),1161-1162.
- [11] Taylor, E. N.; Curhan, G. C. (2006). Diet and fluid prescription in stone disease. Kidney International. 70, 835.

- [12] Archer, H. E.; Dormer, A. E.; Scowen, E. G.; Watts, R. W. E. (1991). Studies on the urinary excretion of oxalate by normal subjects. *Clinical Science*. 1957, (16) 405-409.
- [13] Ilarsan, H.; Palmer, R.; Imsande, J.; Horner, T. (1997). Quantitative determination of calcium oxalate and oxalate in developing seeds of soybean (*leguminosae*). *American Journal of Botany*. 84(9) 1042-46.
- [14] Ladwig, P. M.; Liedtke, R. R.; Larson, T. S. (2005). Sensitive spectrophotometric assay for plasma oxalate. *Clinical Chemistry*. 51(12), 2377-2380.
- [15] Muñoz, J. A.; López, M.; Valiente, M. (2010). Development and validation of a simple determination of urine metabolites (oxalate, citrate, uric acid and creatinine) by capillary zone electrophoresis. *Talanta*. 81, 392-397.
- [16] Zhao, J.C.; Guo, Z. A.; Chang, J. H.; Wang, W. J. (2001). Study on reversed-phase high performance liquid chromatography separation condition and determination method of organic acids. *Chinese Journal of Chromatography*. 19, 260–263.
- [17] Khaskhali, M. H.; Bhangar, M. I.; Khand, F. D. (1996). Simultaneous determination of oxalic and citric acids in urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography*. 675, 147-151.
- [18] Hall, E. A. H. (1992). Overview of Biosensors. In: P.G. Edelman, J. Wang (Eds.), *Biosensors and Chemical sensors, optimizing performance through polymeric materials*, ACS Symposium series, 487, 1–5.
- [19] Peterson, J. I.; Vurek, G. G. (1984). Fiber optic sensors for biomedical applications. *Science* 224, 123–127.
- [20] Danielsson, B.; Mosbach, K. (1987). Theory and application of calorimetric sensors. In: Turner, A.P.F., Karube, I., Wilson, G.S. (Eds.), *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, London and New York.

575–595.

[21] Abad, J. M.; Pariente, F.; Hernández, L.; Abruna, H. D.; Lorenzo, E. (1998). Determination of organophosphorus and carbamate pesticides using a piezoelectric biosensors. *Anal. Chem.* 70, 2848–2855.

[22] Sukeerthi, S., Contractor, A. Q. (1994). Applications of conducting polymers as sensors. *Indian Journal of Chemistry.* 33A, 565–571.

[23] Alegret, S.; Del Valle, M.; Merkoçi, A. (2004). *Sensores electroquímicos.* . Barcelona, España. Universitat Autònoma de Barcelona. pp 28-40.

[24] Yamanaka, H.; Alegret, S.; Pividori, M. I.; Ferreira, A. (2009). *Biosensores electroquímicos.* Barcelona, España. Universitat Autònoma de Barcelona. pp 15-42.

[25] Brunetti, B.; Ugo, P.; Moretto, L.M.; Martin, C.R. (2000). Electrochemistry of phenothiazine and methyl viologen biosensor electron transfer mediators at nanoelectrode ensembles. *Journal of Electroanalytical Chemistry.* 491, 166–174.

[26] Dubinin, A.G.; Li, F.; Li, Y.; Yu, J. (1991). A solid state immobilized enzyme polymer membrane microelectrode for measuring lactate ion concentration. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics.* 25, 131–135.

[27] Karyakin, A. A.; Karyakina, E. E.; Schuhmann, W.; Schmidt, H. L.; Varfolomeyev, S. D. (1994). New amperometric dehydrogenase electrodes based on electrocatalytic NADH-oxidation at poly(-methylene blue)-modified electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry.* 6, 821–829.

[28] Eggins, B. R. (2004). *Chemical sensors and biosensors.* Inglaterra. John Wiley & Sons, Ltd. 154-163.

[29] Molina, C.R.; Boujtita, M.; Murr, N.E. (1999). A carbon paste electrode modified by entrapped toluidine blue O for amperometric determination of L-lactate. *Analytica Chimica Acta.* 401, 155–162.

- [30] Dyson, G.; Hamilton, A.; Mitchell, B.; Gareth, R. (2009). A new family of flexible scorpionate ligands based on 2-mercaptopyridine. *The Royal Society of Chemistry Journal*. 6120-6126.
- [31] Guisan, J. M. (2006). Immobilization of enzymes and cells. Campàs, M; Marty, J. L. *Encapsulation of Enzymes Using Polymers and Sol-Gel Techniques*. Madrid, España. Humana press. 77-85.
- [32] Saiyed, Z. M.; Telang, S. D.; Ramchand, C. N. (2003) Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine. *Biomagnetic Research and Technology*. 1:2.
- [33] Milardović, S.; Grabarić, Z.; Tkalčec, M. (2000). Determination of oxalate in urine, using an amperometric biosensor with oxalate oxidase immobilized on the surface of a chromium hexacyanoferrate-modified graphite electrode. *Journal of AOAC International*. (83) 5. 1212-1217.
- [34] Milardović, S.; Grabarić, Z.; Grabarić, B. S. (2000). Sensitive amperometric oxalate biosensor for food analysis. *Food Technology and Biotechnology*. (38) 3. 203–210.
- [35] Mishra, R.; Yadav, H.; Pundir, C. S. (2010). An amperometric oxalate biosensor based on sorghum leaf oxalate oxidase immobilized on carbon paste electrode. *Analytical Letters*. (43). 151–160.
- [36] Pundir, C. S.; Nidhi, C.; Rajneesh; Verma, M.; Ravi. (2011). A novel amperometric biosensor for oxalate determination using multi-walled carbon nanotube-gold nanoparticle composite. *Sensors and Actuators B*. (155) 796-803.
- [37] Milardović, S.; Kereković, I.; Nodilo, M. (2008). A novel bioamperometric biosensor for urinary oxalate determination using flow-injection analysis. *Talanta*, 77. 222-228.
- [38] Hsing, I. M.; Xu, Y.; Zhao, W. (2006). Micro- and nano- magnetic particles for

applications in biosensing. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co .KGaa. 755 – 768.

[39] Nomura, A.; Shigemitsu, S.; Othman, O. M.; Kauffman, J. M. (2004). Preparation, characterization, and application of an enzyme-immobilized magnetic microreactor for flow injection analysis. *Analytical Chemistry*. (76), 5498-5502.

[40] Huang-Hao, Y.; Shu-Qiong, S.; Xiao-Lan, C.; Zhi-Xia, Z.; Jin-Gou, X.; Xiao-Ru, W. (2004). Magnetic-containing spherical silica nanoparticles for biocatalysis and bioseparations. *Analytical Chemistry*. (76) 1316-1321.

[41] Jianping, L.; Xiaoping W.; Yonghai, Y. (2009). Synthesis of magnetic nanoparticles composed by Prussian blue and glucose oxidase preparing highly sensitive and selective glucose biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*. (139) 400-406.

[42] Aguilar, K.; Rodríguez, J. A.; Barrado, E. (2010). Magnetic solids in analytical chemistry: A review. *Analytica Chimica Acta*. (674) 157-165.

[43] Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J. (1997). *Fundamentos de Química Analítica*. Barcelona:Reverté.

[44] Rodríguez, J. A.; Espinosa, J.; Aguilar, K.; Ibarra, I. S.; Miranda, J. (2010). Determination of tetracyclines in milk samples by magnetic solid phase extraction flow injection analysis. *Microchimica Acta*. (171) 407-413.

[45] Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Affolter, C. *Structure determination of organic compounds (tables of spectral data)*. Springer. NY. 312.

[46] Dutz, S.; Clement, J. H.; Eberbeck, D.; Gelbrich, T.; Hergt, R.; Müller, R.; Wotschadlo, J.; Zeisberger, M. (2009). Ferrofluids of magnetic nanoparticles for biomedical applications. (321) 1501-1504.