



Tesis Doctoral

**Desarrollo y validación de un sistema basado en ENFET para
aplicación en Diálisis**

Presentada por

Carlos Bernardino Silva Cárdenas

para optar el grado de Doctor en Informática

Bellaterra, Diciembre 2008.

El Dr. Jordi Aguiló Llobet, Profesor Catedrático de Universidad del Área de Arquitectura y Tecnología de Computadores del Departamento de Microelectrónica y Sistemas electrónicos de la Universidad Autónoma de Barcelona

CERTIFICA

Que la memoria Desarrollo y validación de un sistema basado en ENFET para aplicación en Diálisis que presenta Carlos Bernardino Silva Cárdenas para optar el grado de Doctor en Informática ha sido realizada bajo su dirección.

Bellaterra, Diciembre 2008.

Dr. Jordi Aguiló Llobet

A mi hija y mi esposa: Penélope y Helga
A mis padres : Rebeca y Carlos

Agradecimientos

Con estas líneas deseo agradecer a todas las personas que colaboraron conmigo en la culminación de la presente Tesis de manera especial al Dr. Jordi Aguiló por la ayuda constante, confianza y orientación certera. A todas las personas del Instituto de Microelectrónica de Barcelona que de diferentes maneras me ayudaron.

A los colegas del proyecto ALFA-Biosenintg por mostrarme sus contribuciones que han enriquecido el presente trabajo, especialmente al Dr Manel Del Valle por sus recomendaciones.

A la Pontificia Universidad Católica del Perú, en la persona del Ing. Luis Guzmán Barrón por su ayuda en todo este tiempo, al grupo de investigación de Microelectrónica por seguir contribuyendo de manera noble al avance de esta temática en nuestro país.

A todos ellos les digo estas dos palabras que resumen mi agradecimiento sincero: Muchas Gracias.

INDICE

	Pag.
INTRODUCCION	1
REFERENCIAS	7
CAPITULO I. SENSORES QUIMICOS	9
I. SENSORES QUIMICOS	10
I.1 TRANSDUCTORES QUIMICOS	10
I.1.1. GRAVIMETRICOS	11
I.1.2. TERMICO	11
I.1.3 OPTICO	11
I.1.4 ELECTROQUIMICO	11
I.1.4.1 SENSORES CONDUCTIMETRICOS	12
I.1.4.2 SENSORES AMPEROMETRICOS	12
I.1.4.3 SENSORES POTENCIOMETRICOS	13
I.1.4.3.1 ISE	14
I.1.4.3.2 ISFET	15
I.2. MODELO DE LA DOBLE CAPA ELECTRICA	21
REFERENCIAS	25
CAPITULO II: BIOSENSORES	28
II. BIOSENSORES	29
II.1 BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS	31
II.1.1 BIOSENSORES ENZIMATICOS	31
II.1.1.1 BIOSENSORES POTENCIOMETRICOS	31
II.1.1.1.1 ENZIMA	31
II.1.1.1.2 CATALISIS	33
II.1.1.1.3 CINETICA ENZIMATICA	34
II.1.1.1.4 INMOVILIZACION DE LAS ENZIMAS	38
II.1.1.1.5 INFLUENCIA DE LA INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS	43
II.1.1.2 EL EnFET	43
II.1.1.2.1 PRINCIPIO DE FUNCIONAMIENTO DE LOS EnFETs	44
REFERENCIAS	47

CAPITULO III: ASPECTOS CLINICOS	50
III. ASPECTOS CLINICOS SOBRE MEDICION DE LA CONCENTRACIÓN DE UREA	51
III.1 EL SISTEMA RENAL	51
III.2 INSUFICIENCIA RENAL CRONICA	51
III.3 HEMODIALISIS	54
III.4 MODELOS CINETICOS DE UREA EN HEMODIALISIS	55
III.4.1. MODELO SIMPLIFICADO	56
III.4.2 MODELO MONOCOMPARTIMENTAL DE VOLUMEN FIJO	57
III.4.3 MODELO MONOCOMPARTIMENTAL DE VOLUMEN VARIABLE	58
III.4.4 MODELO BICOMPARTIMENTAL	58
III.4.5 CUANTIFICACION DIRECTA DEL DIALIZADO	59
III.4.6 CONCLUSION ACERCA DE LOS MODELOS CINETICOS DE UREA	60
III.4.7 METODOS DE MEDICION DE CONCENTRACION DE UREA	60
III.4.8 MEDICION DE CONCENTRACION DE UREA EN LIQUIDO DIALISADO	61
REFERENCIAS	63
CAPITULO IV: PREPARACION DEL ENFET	65
IV. PREPARACIÓN DEL ENFET PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE UREA	66
IV.1 PARTE EXPERIMENTAL	66
IV.1.1 MEDIOS EXPERIMENTALES UTILIZADOS	66
IV.1.1.1 APARATOS	66
IV.1.1.2 ELECTRODOS	67
IV.1.1.3 REACTIVOS Y SOLUCIONES	68
IV.1.2 PRIMERA ETAPA: PREPARACION DEL ENFET	69
IV.1.2.1 PREPARACION DEL TRANSDUCTOR	69
IV.1.2.2 PREPARACION DE LA MEMBRANA ENZIMATICA	73
IV.1.2.3 EVALUACION DE LOS ENFETs	76
IV.1.2.4 SISTEMA DE EVALUACION	76
IV.1.2.5 PARAMETROS DE CALIBRACION	77
IV.1.2.6 REPRODUCIBILIDAD DE LA LECTURA DEL POTENCIAL ELECTRICO	78
IV.1.2.7 CARACTERISTICAS DINAMICAS DE LA RESPUESTA	78
IV.1.2.8 CARACTERIZACION ELECTRICA DEL ENFET	78
IV.1.2.9 RESULTADOS Y DISCUSION	79
IV.1.2.9.1 ESTUDIO DEL METODO DE EVALUACION	79

IV.1.2.9.2 PARAMETROS DE CALIBRACION	80
IV.1.2.9.3 REPRODUCIBILIDAD DE LA RESPUESTA	84
IV.1.2.9.4 CARACTERISTICAS DINAMICAS DE LA RESPUESTA	85
IV.1.3 SEGUNDA ETAPA: MEDICION DE LA CONCENTRACION DE UREA USANDO EL ENFET EN MUESTRAS REALES	87
IV.1.3.1 PARTE EXPERIMENTAL	87
IV.1.3.1.1 SISTEMA DE EVALUACION	88
IV.1.3.1.2 PARAMETROS DEL DISPOSITIVO	88
IV.1.3.2 RESULTADOS Y DISCUSION	88
IV.1.3.2.1 ESTUDIO DEL METODO DE EVALUACION	88
IV.1.3.2.2 PARAMETROS DE CALIBRACION	90
IV.1.3.2.3 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE UREA EN LIQUIDO DIALIZADO	91
CAPITULO V: CONCLUSIONES	95

INTRODUCCION

Reciben el nombre de biosensores aquellos dispositivos capaces de realizar la medida de una cierta magnitud, utilizando para ello, directa o indirectamente, un determinado compuesto de tipo biológico. Por su parte, algunos autores coinciden en denominar biosensores a todos aquellos dispositivos capaces de realizar medidas de tipo biológico independientemente de su principio básico de funcionamiento. En los últimos treinta años, los biosensores han experimentado un desarrollo tecnológico muy importante y especialmente como aplicaciones de los Ion-Sensitive Field Effect Transistors (ISFETs) a la medida de magnitudes normalmente de tipo químico. Esto es apreciable desde la aparición del primer trabajo[1] realizado en 1980 por Caras y Janata consistente en un ISFET sobre cuya puerta se depositó un componente biológico (penicilinas) generándose reacciones biocatalíticas de reconocimiento y la aparición de complejos enzima-sustrato.

Este trabajo y otros realizados en la década de los '70 del siglo pasado, aumentó el interés en los ISFETs con la finalidad de crear dispositivos que reconocieran selectivamente moléculas y iones en soluciones o gases. Los trabajos sobre membranas capaces de albergar enzimas, células, antígenos que se ubicaban sobre el óxido aislante de puerta del ISFET con la finalidad de detectar sustancias, dio origen a dispositivos conocidos hoy como MeMFETs (Membrane Field-Effect Transistors), EnFETs, (Enzyme-modified Field Effect Transistors) e ImmFETs (Immuno- Field-Effect Transistors). Todos ellos están basados en el principio de efecto de campo, en el que la corriente superficial del semiconductor se modula mediante las variaciones del potencial en la puerta, generalmente constituida por la interfase aislante-electrolito [2]. Otro de los dispositivos que trabajan bajo este principio con variaciones en su constitución es el OFET (Organic Field-Effect Transistors) basados en soluciones procesadas poliméricas. Un OFET muestra un oligómero o polímero como semiconductor orgánico (ejemplo: poli(2,5-thienylene vinylene) PTV), un aislante de puerta tal como el PMMA (polimetil-metacrilato) ubicado sobre la puerta del dispositivo constituido por un sustrato de silicio altamente dopado y actuando como electrodo. Trabajos realizados utilizando dieléctricos orgánicos están generando OFETs de gran desempeño[3-6].

Siguiendo el principio básico de efecto de campo, una de las aplicaciones de mayor éxito ha sido la medición de pH mediante el uso de un ISFET cuyo óxido de puerta

formado por una capa de nitruro de silicio y dióxido de silicio constituye una membrana selectiva a los iones H^+ . El éxito de este dispositivo radica en el hecho que puede ser fabricado utilizando los mismos materiales aislantes usados habitualmente en la tecnología de los semiconductores y fabricación de circuitos integrados, tales como: SiO_2 , Si_3N_4 o Al_2O_3 .

Los biosensores basados en ISFETs más desarrollados hasta hoy son los enzimáticos, esto es, los EnFETs, basados en las reacciones biocatalíticas de reconocimiento y formación de complejos sustrato-enzima. Los EnFETs descritos en la bibliografía [7-16] están referidos en su mayoría a la determinación de urea, glucosa y penicilina basándose en la medida indirecta del pH. De acuerdo a lo mencionado anteriormente, Caras y Janata desarrollaron el primer EnFET sobre la base de un ISFET de pH para la determinación de la concentración de penicilina. Con este dispositivo se observa la influencia que ejerce la capacidad amortiguadora de la solución en la sensibilidad y en el rango de respuesta del sensor. Posteriores estudios teóricos demostraron que la respuesta de estos sensores estaba afectado por la velocidad de transporte difusional de las especies que reaccionan; los resultados experimentales obtenidos con ISFETs de glucosa y penicilina se ajustaban “a posteriori” con la reacción enzimática y los equilibrios obtenidos.

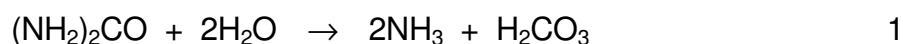
ESTUDIOS PREVIOS SOBRE ENFET DE UREA

A partir de los resultados del primer EnFET, basado en la medida del pH y de los que continuaron en esta línea, se sometió a estudio el mecanismo de respuesta para diferentes condiciones de medida. Caras y Janata [17-19], establecieron un modelo teórico sobre la base de los fenómenos de transporte y cinética molecular que tienen lugar en la superficie de la membrana. Este modelo señala que la respuesta del sensor dependía de la capacidad amortiguadora de la solución de manera que para capacidades amortiguadoras altas, el límite de detección aumenta y la sensibilidad disminuye. Posteriormente, Eddowes [20-22] sugirió que para cinéticas enzimáticas bastante rápidas, el límite inferior de respuesta estaba determinado por la capacidad amortiguadora de la solución, siendo la reacción en esta zona limitada por fenómenos de transporte, mientras que el límite superior de respuesta viene definido por la constante de Michaelis-Menten de la enzima.

Más tarde, Glab y sus colaboradores establecieron un modelo teórico basado en las reacciones de disociaciones de todas las especies presentes. Los resultados de los valores experimentales encontrados con un sensor de urea confirmaron su hipótesis.

Uno de los campos donde los EnFETs tienen aplicaciones importantes es la salud, donde se han realizado considerables avances apuntando entre otros aspectos a reemplazar las prestaciones que ofrecen los Electroodos Selectivos de Iones (ISE, Ion Selective Electrode) por los ENFETs debido a las ventajas que ofrecen como son sus pequeñas dimensiones, baja impedancia de salida, parámetros eléctricos adecuados (corriente y tensión de polarización pequeñas), buena respuesta al ruido así como la posibilidad de producción industrial masiva a partir de la tecnología de base utilizada en la fabricación de circuitos integrados, lo que adicionalmente permite conseguir como valor añadido, otras ventajas tales como la fabricación de multisensores, la integración en un único “chip” del dispositivo sensor junto con el circuito de procesamiento de señal apropiado y el conseguir un primer encapsulado automático a nivel oblea. Otro tipo de ventajas dependiendo de la aplicación se derivan de las pequeñas dimensiones del dispositivo sensor lo que posibilita trabajar con pequeñas cantidades de solución a analizar con el consiguiente ahorro de muestras y reactivos químicos.

Una aplicación importante, sobre la que versa el trabajo de investigación que se expone en esta memoria, consiste en la “monitorización” del tratamiento que se hace a los enfermos del riñón que deben ser sometidos a diálisis periódicamente. Este tratamiento consiste en ver como ha evolucionado fundamentalmente la concentración de urea del paciente previamente a la diálisis. Por otro lado se considera la observancia de la urea por tratarse del producto final de la degradación de las proteínas en el cuerpo humano aumentando a medida que decrece la velocidad de filtración glomerular. Para la medición de la concentración de la urea existen varios métodos que parten de la reacción de tipo hidrólisis catalizada por la enzima ureasa:



Estos métodos se basan en la medida de la concentración de los productos de la reacción antes señalada tal como: NH_3 , CO_2 , NH_4^+ y H^+ . Manteniendo un medio de pH constante, la concentración de los productos de la reacción enzimática aumentan linealmente con la concentración de la urea añadida y por lo tanto la respuesta

obtenida será de tipo Nernstiana para sensores de NH_3 , NH_4^+ y CO_2 . Sin embargo cuando el sensor interno es de pH, la respuesta no sigue el mismo comportamiento en todo el rango de medida debido a que la variación de pH no es proporcional a la cantidad de urea añadida sino que esta determinada por los equilibrios de disociación de las especies presentes en la solución.

Otro de los métodos para la determinación de la concentración de urea son los espectrométricos [23] que no pueden ser aplicados directamente a muestras coloreadas o fluidos biológicos. Los métodos convencionales de determinación de urea están basados en su mayoría en una reacción directa del color [24-26] o en las mediciones espectrométricas del amonio que se produce mediante la hidrólisis de la urea a través de la ureasa [27,28]. Desafortunadamente estos métodos implican complicados y delicados procedimientos que los inhabilitan para la realización de una monitorización continuada del paciente durante el proceso de diálisis.

Últimamente se viene trabajando con resultados importantes con las denominadas “lenguas bioelectrónicas potenciométricas” para el análisis de urea y iones alcalinos en muestras clínicas, su implementación implica el uso de un arreglo de biosensores y de electrodos selectivos de iones con dos técnicas de calibración multivariada[29].

OBJETIVO DE LA TESIS

El trabajo de investigación que se describe en la presente memoria se plantea como objetivo el desarrollo de un EnFET con aplicación clínica en la medición de la concentración de urea de manera indirecta en líquido dializado para propósito de diagnóstico clínico más rápido, exacto y utilizando pequeñas cantidades de componentes químicos, específicamente en diálisis. El ENFET implementado atiende a la reacción química antes descrita utilizando una membrana enzimática con la ureasa como la enzima escogida por catalizar a la urea.

Para conseguir el objetivo planteado, se ha diseñado y puesto a punto la tecnología de fabricación del ISFET. Sobre la base de los resultados obtenidos por el propio autor en el desarrollo de su tesina, se ha desarrollado el tratamiento previo del transductor ISFET, su acondicionamiento y obtención de la sensibilidad adecuada para la aplicación clínica que se persigue. Se ha puesto también a punto el proceso de formación de la membrana enzimática conveniente, así como la técnica de

inmovilización de la enzima ureasa y la “fijación” de la enzima ureasa sobre el transductor ISFET. La fijación de la membrana es uno de los puntos críticos del micro-sensor puesto que el período de vida del dispositivo depende totalmente de la “calidad” de la misma. Finalmente se han caracterizado los dispositivos EnFET obtenidos.

El trabajo realizado ha generado un ENFET de fácil industrialización, con un tiempo de vida superior a dos meses y medio, eficiente para la medida indirecta de la concentración de urea en sangre a partir de la medida de la concentración de urea en el líquido dializado.

El dispositivo se ha verificado en laboratorio realizando medidas de la concentración de urea sobre muestras ideales y comparando las medidas obtenidas con el dispositivo con medidas realizadas según procedimientos analíticos convencionales.

Posteriormente, el dispositivo se ha validado en aplicación realizando medidas de concentración de urea en muestras de líquido dializado de pacientes del Hospital Parc Tauli recogidas en distintas etapas del proceso de diálisis y procediendo a comparar y hacer las correlaciones respectivas con los valores medidos sobre las mismas muestras por personal clínico especializado en el trabajo con pacientes renales y sometidos a diálisis frecuente.

Con los resultados satisfactorios que se han obtenido se tiene el camino expedito para integrar todo un sistema que además del sensor antes descrito también considere la electrónica de procesamiento de la señal apuntando a distintos objetivos: (1) Disponer de medidas continuadas del proceso de hemodiálisis que permitan objetivar la calidad del mismo. (2) Personalizar el proceso dependiendo de las características particulares de cada paciente y también de las condiciones específicas en que se encuentre en el momento de iniciar cada tratamiento periódico, ya que la ingesta, el estado físico, el ejercicio realizado, etc. en los días inter-proceso, influyen notablemente en la necesidad de un mayor o menor tiempo de proceso (3) Adecuar la velocidad de extracción a las necesidades puntuales consiguiendo menores tiempos de diálisis y evitando el riesgo de pérdidas bruscas de presión, mareos, etc.

Finalmente indicar que el presente trabajo generó papers en función de los avances que se realizaban y que aparecen en las memorias de los congresos

BIOSENSORS2000, BIOSENSORS2002, SBCCI2000(Congreso Brasileño de Concepción de Circuitos Integrados).

ORGANIZACION DE LA MEMORIA

En los capítulos I y II se introducen los distintos tipos de sensores y biosensores respectivamente dando las referencias adecuadas para situar al lector en el estado del arte.

El capítulo III se dedica a estudiar los aspectos clínicos más relevantes del proceso de hemodiálisis con la idea de introducir al lector en los conceptos y técnicas y detalles que se consideran relevantes para la comprensión de la idea general y del objetivo de la investigación realizada con esta finalidad clínica.

En el capítulo IV se detallan todos aquellos aspectos tecnológicos investigados y desarrollados para la puesta a punto de la tecnología de fabricación de los dispositivos EnFET adecuados para la aplicación que se persigue. Se dan también y se discuten en este capítulo, los resultados obtenidos y la evaluación en laboratorio de los dispositivos desarrollados por tanto se muestra la experimentación y validación del dispositivo sobre la aplicación.

Por último, en el capítulo V se resumen brevemente las principales aportaciones y conclusiones que se desprenden del presente trabajo así como una síntesis de los trabajos que, sobre esta base, se pretenden realizar en un futuro.

REFERENCIAS

1. S. Caras, J. Janata; Field effect transistor sensitive to penicillin; *Anal. Chem.* 52; (1980) 1935-1937.
2. L. Bousse, N.F. De Rooij, P. Bergveld; *IEEE Trans. on Electron Devices*, Vol. Ed. 30, No. 10, (Oct. 1983)
3. Horowitz G, Hajlaoui R, Bourgouiga R, Hajlaoui M. Theory of Organic Field-Effect Transistors. *Synth. Met.* 101:401. (1999).
4. Brown AR, Jarrett CP, de Leeuw DM, Matters M. Field-Effect Transistors Made From Solution- Processed Organic Semiconductors. *Synth. Met.* 88:37. (1997).
5. Horowitz G. . Organic Field-Effect Transistors. *Adv. Mater.* 10:365. (1998).
6. Kelley TW, Muyres DV, Baude PF, Smith TP, Jones TD. . High performance organic thin film transistors, in *Organic and Polymeric Materials and Devices*, edited by P.W.M. Blom, N.C. Greenham, C.D. Dimitrakopoulos, and C.D. Frisbie. (*Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 771, Warrendale, PA), L6.5.1. (2003).
7. S. Shiono, Y. Hanazato, M. Nakako; Urea and glucose sensor based on ion sensitive field effect transistor with photolithographically patterned enzyme membrane, *Anal. Sci.*, 2 (1986) 517-526.
8. J. Anzai, S. Tuzuka, T. Osa, H. Nakajima, T. Matsuo; Urea sensor based an ion-sensitive field effect transistor. IV. Determination of urea in human blood, *Chem. Pharm. Bull.*, 35 (1987) 693-698.
9. O.A. Boubriak, L.M. Khustochka, O.P. Soldatkin, M. F. Starodub; Study of immobilisation and properties of urease to create biosensor based on semiconductor structures; *Ukr. Biochem. J.*, 64 (1992) 66-71.
10. Y. Miyahara, T. Moriizumi, K. Ishimura; Integrated enzyme FETs for simultaneous detection urea and glucose; *Sensors and Actuators*, 7 (1985) 1-5.
11. Karube, S. Suzuki; Amperometric and potentiometric determinations with immobilised enzymes and microorganisms; *Ion.Selective Electrode Rev.*,6 (1984) 15-18.
12. F. Gardiies, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, H. Perrot, J. M. Valleton, S. Allegret; Micro-enzyme field effect transistor sensor using direct covalent bonding urease; *Anal. Chim. Acata*, 231 (1990) 305-308.
13. Y. Miyahara, F. Matsu, T. Moriizumi, H. Matsuoka, I. Karube, S. Suzuki en Kodansha (Ed.), *Proceedings of the International Meeting on Chemical Sensors*, 1983, p. 501.
14. I. Karube, *Makromol. Chem. Macromol. Symp.*, 17 (1988) 419.

15. L. Campanella, F. Mazzei, C. Morgia, M.P. Sammartino, M. Tomassetti, V. Baroncelli, M. Battilotti, C. Colapicchioni, I. Giannini, F. Porcelli; *Analisis*, 16 (suppl. 9,10) (1988) 120.
16. S. Nakamoto, N. Ito, T. Kuriyama, J. Kimura; *Sensors and Actuators*, 13 (1988) 165.
17. S. D. Caras, J. Janata, D. Saupe, K. Schmitt; *Anal. Chem.* 57, (1985) 1917.
18. S. D. Caras, D. Petelenz, J. Janata; *Anal. Chem.* 57, (1985) 1920.
19. S. D. Caras, J. Janata; *Anal. Chem.* 57, (1985) 1924.
20. M. J. Eddowes; Response of an Enzyme-Modified pH-Sensitive Ion selective Device; Consideration of the influence of the buffering capacity of the Analyte Solution; *Sensors and Actuators*, 7 (1985) 97-115.
21. M. J. Eddowes, D. G. Pedley, B.C. Webb; *Sensors and Actuators* 7 (1985) 233.
22. M. J. Eddowes, D. G. Pedley, B.C. Webb; *Sensors and Actuators* 8(1985) 179.
23. I. Karube, E. Tamiya, J. Dicks; A microsensor for urea based on an Ion-selective Field Effect Transistor; *Anal. Chem. Acta*, 185 (1986) 195-200.
24. H. L. Rosenthal; *Anal. Chem.* 27 (1955) 1980.
25. R. L. LeMar, D. Bootzin; *Anal. Chem.* 29 (1957) 1233.
26. R.M. Archibald; Colorimetric determination of urea; *J. Biol. Chem.* 157 (1945) 507-18.
27. J. K. Fawcett, J. E. Scott; *J. Clin. Pathol.*, 13 (1960) 156.
28. M.W. Weatherburn; Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.*, 39 (1967) 163-6.
29. M. Gutierrez, S. Alegret, M. Del Valle; Potentiometric bioelectronic tongue for the analysis of urea and alkaline ions in clinical samples; *Biosensors&Bioelectronics* 22 (2007), 2171-2178.

CAPITULO I: SENSORES QUIMICOS

I. SENSORES QUIMICOS

Los sensores químicos son dispositivos capaces de transformar información “química” (composición, presencia de determinado elemento o ión, concentración, actividad química, presión parcial, etc.) en una señal analíticamente útil [1].

Están formados por dos elementos: el receptor, y un transductor. El receptor es un elemento de reconocimiento molecular o iónico que interacciona selectivamente con el componente específico (analito) que se encuentra en la muestra, generando una señal físico-química que el transductor transformará en una señal procesable (generalmente eléctrica). Los dos elementos del sensor químico reseñados pueden encontrarse integrados o no, pero de cualquier forma deben estar conectados, debido a que la señal generada en la reacción de reconocimiento (de tipo electroquímico, óptico, térmico o másico) será transformada por el transductor en una señal que en último término es del dominio eléctrico. La “conexión” entre el elemento receptor y el transductor se materializa mediante los procesos conocidos como inmovilización [2].

Cuando la parte receptora y el transductor se encuentran integrados, formando un mismo componente, al elemento transductor se le considera como un sensor químico. En otros casos para prevenir las interferencias que modifiquen el correcto proceso de transducción se utilizan membranas que separan al transductor del receptor. Lo anterior implica que los transductores deben su acción a un material con propiedades determinadas de transducción (por ejemplo, un cristal piezoeléctrico) como a un dispositivo que facilita un tipo de transducción determinada (por ejemplo, un dispositivo de ondas acústicas superficiales).

I.1 TRANSDUCTORES QUIMICOS

Una de las clasificaciones que se hace de los sensores químicos es considerando el principio de funcionamiento del elemento transductor. Los transductores químicos son un tipo de sensor que dan una respuesta, generalmente eléctrica u óptica, en función de un parámetro físico-químico. Los transductores más importantes para la medida de parámetros químicos son: Los Electrodo selectivo a iones (ISE), sensores amperométricos, Transistores de efecto de campo sensibles químicamente (Chemical

Field Effect Transistor, ChemFET), sensores piezoeléctricos sensibles químicamente y los transductores ópticos (optrodes).

Los principios de transducción utilizados en los sensores químicos en general, se pueden clasificar en [3]:

I.1.1 GRAVIMÉTRICOS

Los sensores que utilizan el principio de transducción gravimétrico, llamados también sensores gravimétricos, se basan en la medición de un cambio de masa originada por la acumulación selectiva del analito sobre una superficie modificada y que logra modificar la propiedad del material transductor. En este caso, los transductores proporcionan una muy alta resolución y estos pueden ser: dispositivos de onda acústica superficial (SAW) o cristales piezoeléctricos.

I.1.2. TERMICOS

Para el caso de sensores térmicos, estos transforman el efecto calorífico de la interacción entre el analito y el receptor en una señal eléctrica. Los transductores más utilizados son los termistores o dispositivos piroeléctricos. Los termistores presentan un principio de operación basado en la medición de la diferencia de temperatura debido a una reacción enzimática de tipo exotérmica o endotérmica.

I.1.3. ÓPTICOS

Los sensores ópticos, utilizan el efecto de las reacciones químicas sobre fenómenos ópticos, que se originan debido a la interacción entre analito y receptor, produciendo finalmente señales generalmente optoelectrónicas. Los detectores más conocidos son: fotodiodos, fototransistores e interferómetros.

I.1.4. ELECTROQUÍMICOS

Finalmente, los sensores electroquímicos transforman la interacción electroquímica entre el analito y el receptor en una señal eléctrica. El parámetro medido puede ser la conductividad entre dos electrodos o la intensidad de corriente a través de un electrodo polarizado o el potencial entre dos electrodos. Dichas mediciones se realizan basados en principios de la química electroanalítica tales como: Conductimetría, Amperometría y Potenciometría. Los transductores electroquímicos son los que más publicaciones científicas han generado en los últimos años [4,5].

Veremos a continuación las características más importantes de estos sensores, considerando el tipo de transducción electroquímico.

I.1.4.1 SENSORES CONDUCTIMETRICOS

Estos dispositivos están basados en la medida de la variación de la conductividad entre dos electrodos inmersos en una solución provocados por el analito. Esta conductividad es medida al aplicarse un potencial de pequeña amplitud de corriente alterna para evitar la polarización en la sustancia. La presencia de elementos iónicos genera un incremento en la conductividad cuya evaluación permite la medición indirecta de ciertas especies. Esta forma de medición se suele utilizar para caracterizar algunos líquidos y/o superficies de electrodos modificados[6,7].

Los transductores conductimétricos para biosensores han sido desarrollados hace poco más de tres décadas aproximadamente [8]. Muchas reacciones catalizadas por enzima han sido estudiadas en soluciones homogéneas usando métodos conductimétricos. Un trabajo inicial en esta área se realizó con urea y usando como enzima a la ureasa, estando el sustrato inicialmente descargado para luego realizarse la hidrólisis y alcanzar especies cargadas [9,10]. También se han desarrollado biosensores conductimétricos mediante la modificación de electrodos con material biológico atrapado en polímeros conductores[11,12].

Un aspecto peculiar de este tipo de biosensores es que, al contrario de lo que sucede con los ISFET, no necesitan electrodo de referencia.

I.1.4.2 SENSORES AMPEROMETRICOS

El principio amperométrico consiste en la medición de la corriente que fluye en un electrodo como resultado de la aplicación de un potencial al mismo respecto a un electrodo de referencia. Un tercer electrodo, denominado auxiliar, es necesario en la mayoría de casos para completar la celda electroquímica[13]. Mediante esta técnica se obtienen respuestas de intensidad de corriente que son función lineal de la concentración.

La corriente medida tiene tres fuentes diferentes. La primera es una corriente de tipo capacitivo que fluye a través de la celda y se debe al proceso de carga y descarga de

la doble capa electroquímica. La segunda, es una corriente de tipo faradaico la cual se origina por las reacciones químicas; esta corriente produce un cambio en el estado redox de algunas especies de la solución o en el mismo material del electrodo. La tercera se debe a la corriente que puede producirse cuando un electrodo se sumerge en un electrolito experimentando efectos de adsorción. De estas tres corrientes, la corriente faradaica es la corriente de mayor interés en el análisis amperométrico.

La corriente faradaica es una medida de la velocidad de la reacción electroquímica que se produce en el electrodo. Esta corriente es directamente proporcional a la concentración de especies reducidas y oxidadas y es muy apropiada para aplicaciones analíticas. Por tanto se aprecia que la corriente implicada en los sensores amperométricos es el resultado de una reacción electroquímica neta

I.1.4.3 SENSORES POTENCIOMETRICOS

Estos sensores entregan la información analítica como una señal de potencial eléctrico a partir de la conversión obtenida en el proceso de reconocimiento. Este potencial eléctrico es proporcional a la actividad (concentración) de especies generadas o consumidas en la etapa de reconocimiento y se genera en la interfase solución-transductor. El potencial eléctrico generalmente es medido bajo condiciones de intensidad de corriente cero. Este tipo de transducción es muy importante para la aplicación con biosensores debido a su selectividad, simplicidad y bajo coste.

La relación entre el potencial eléctrico y la actividad del analito esta expresada por la ecuación de NERNST:

$$E = E^0 + \frac{2.303RT}{nF} \log(a_i) \quad 1.1$$

Donde:

E es la fuerza electromotriz del electrodo selectivo de iones

E^0 es el potencial normal del electrodo de referencia a las condiciones estándar.

a_i es la actividad del ión primario a ser estudiado.

R es la constante de los gases ($8.3144 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$)

T es la temperatura absoluta

n es el número de carga del ión

F es la constante de Faraday ($9.6485 \times 10^4 \text{ Cmol}^{-1}$)

La “actividad” indica la capacidad reactiva de los iones en la solución. En términos prácticos se trabaja más con la concentración del ión principal que con su actividad la cual esta relacionada con la concentración por el coeficiente de actividad, el cual mide la eficiencia con que una especie influye en un equilibrio. Es importante mencionar que la concentración de una especie iónica en solución esta afectada por la fuerza iónica. Esta propiedad altera la capacidad reactiva de los iones en la solución debido a las interacciones electrostáticas (atracción y repulsión) entre los mismos, siendo más pronunciada con el aumento de la concentración. En soluciones muy diluidas la fuerza iónica es mínima y no afecta el comportamiento de los iones en la solución [14,15].

Entre los transductores más utilizados para este tipo de sensores se tiene a los electrodos selectivos a iones (ISE)[16] en donde se modifica el electrodo de trabajo con una membrana selectiva a un ión determinado. Otro de los transductores muy usados últimamente son los transistores de efecto de campo sensible a iones, ISFETs [17] y su modificación con membranas selectivas CHEMFET[18].

I.1.4.3.1 ISE

Es uno de los transductores más utilizados en los sensores potenciométricos y se caracteriza por tener una membrana selectiva que establece la preferencia del sensor ante un analito específico en presencia de varios iones interferentes existentes todos en la muestra de trabajo. Si los iones pueden atravesar la frontera entre dos fases, entonces se alcanza un equilibrio químico con potenciales diferentes en las dos fases. Por otro lado, si solamente un tipo de ión puede ser intercambiado entre las dos fases, entonces la diferencia de potencial formada entre las dos fases es gobernada únicamente por la actividad de este ión en aquellas fases.

Cuando la membrana separa dos soluciones de diferente actividades ionicas (a_1 y a_2) y esta condicionada a ser permeable a este simple ión, entonces la diferencia de potencial E através de la membrana es descrita por la ecuación de Nernst vista en la ecuación I.1 pero en función de las actividades iónicas sería :

$$E = \frac{2.303RT}{nF} \log\left(\frac{a_2}{a_1}\right) \quad 1.2$$

Si la actividad del ión específico en la fase 1 se mantiene constante, se tendría la siguiente expresión considerando a_2 (a_i) como la fase de trabajo

$$E = 2.303RT/n_x F \cdot \log (a_i/a_1) = \text{const} + S \cdot \log (a_i) \quad 1.3$$

Donde $S = 59.16/n$ (mV) a 298 K y n es el número de carga del analito. La diferencia de potencial puede ser medido entre dos electrodos de referencia idénticos colocados en dos fases. En la práctica la diferencia de potencial o fuerza electromotriz se mide entre el electrodo selectivo a iones y el electrodo de referencia colocados en la misma solución. Esta medición se realiza cuando la corriente es cero lo cual significa condiciones de equilibrio. El equilibrio significa, en este caso, que la transferencia de iones desde la membrana a la solución es igual a la transferencia desde la solución hacia la membrana. La señal medida es la suma de los diferentes potenciales generados en las interfases sólido-sólido, sólido-líquido y líquido-líquido[19].

La membrana sensible a iones puede ser preparada como : a) una membrana sólida (membrana de vidrio o cristal) ; b) membrana líquida, basada en por ejemplo el intercambiador clásico de iones con portador neutral o cargado ; c) membrana en electrodo especial como es el caso de los electrodos de enzima o las que se usan para sensar gases, en estos casos se requiere de un componente selectivo del analito como responsable del proceso de reconocimiento.

I.1.4.3.2 ISFET

Los sensores de estado sólido han sido ampliamente utilizados en la determinación de especies químicas [20]. Actualmente mediante el uso de sensores químicos basados en silicio se pueden determinar las concentraciones de un gran número de iones en solución [21] siendo uno de estos el ISFET (Ion-Sensitive Field-Effect Transistor) que fue presentado por Bergveld [17,22] como un nuevo dispositivo que combinaba las propiedades químicamente sensibles de las membranas de vidrio con las características de conversión de impedancias de los MOSFETs (Metal-Oxide-Semiconductor-Field-Effect-Transistor).

Un ISFET tiene una estructura similar al de un MOSFET convencional, con la diferencia que el metal de la puerta del MOSFET ha sido reemplazado por un electrodo de referencia y una solución quedando el oxido de puerta del MOSFET en contacto directo con la solución. En la estructura del ISFET, el material selectivo a los iones no colabora en la conducción eléctrica, pero sin embargo es posible detectar la variación del potencial en la interfase aislante-solución, definida termodinámicamente

considerando la superficie de una capa no-hidratada y de una capa aislante ideal pero selectiva a los iones que desempeña el papel de un electrodo selectivo de iones [23].

El principio de funcionamiento del ISFET esta basado en la sensibilidad al pH de la capa aislante inorgánica que se encuentra en contacto directo con la solución, pudiendo ser estos aislantes SiO_2 , Si_3N_4 , Al_2O_3 , Ta_2O_5 . y trióxido de tungsteno amorfo ($\alpha\text{-WO}_3$) [24]. Cualquiera de los tres últimos materiales ofrece una sensibilidad química del dispositivo diferente en el rango de 53-57 mV/pH muy similar a la alcanzada en el caso del Si_3N_4 que suele estar entre 52-56 mV/pH y bastante diferente a la mostrada por el óxido de Silicio que puede estar entre 29-36mV/pH. Sin considerar a este último aislante, los anteriores (Si_3N_4 , Al_2O_3 , Ta_2O_5 . y el $\alpha\text{-WO}_3$) se caracterizan porque proporcionan una gran estabilidad en la respuesta, un tiempo de vida efectivo muy largo y una selectividad muy importante puesto que la influencia de los iones interferentes Na^+ y K^+ en la sensibilidad es muy pequeña [25].

Los fenómenos que explican el comportamiento del ISFET son complejos debido a que intervienen procesos físicos y químicos. El funcionamiento se debe fundamentalmente a un fenómeno superficial que puede ser explicado mediante la Teoría de los Enlaces Locales [26], la Teoría de la Doble Capa Eléctrica y la Teoría de efecto de campo en la estructura electrolito-óxido-semiconductor todo lo cual permite entender los mecanismos de respuesta del ISFET [27].

La Teoría de los enlaces locales indica que en la superficie del aislante, considerada como interfase bloqueada debido a que no se produce intercambio de cargas entre el óxido y el electrolito[26], existen zonas discretas de carga formados por grupos hidroxil (-OH) (considerando que el aislante en contacto con la solución es el SiO_2) que al entrar en contacto con la solución y dado su carácter hidrofílico, se pueden cargar positivamente con un ión hidrógeno o negativamente al perder un protón o quedarse neutros originándose una variación de cargas superficiales que generan potenciales eléctricos que siguen la ecuación de Nernst (sí esto sucede, se dice que el dispositivo tiene respuesta Nernstiana), de esta manera se tiene la relación de la diferencia de potencial en la interfase electrolito/aislante ψ_0 , con la sensibilidad al pH propuesto inicialmente por Yates, Levine y Healy [28] y aplicado por Siu y Cobbold [29] para explicar la operación del ISFET respecto al pH[30].

Para el caso que el aislante en contacto con la solución es el Si_3N_4 se considera que existen dos centros discretos diferentes, uno formado por Si-OH y el otro por N-H_2 que solo se carga positivamente con iones hidrógeno[31]. Por tanto para este caso, se tendrá una superficie siempre cargada debido a que el pH correspondiente al punto donde la carga neta de la superficie es nula, es diferente para cada centro discreto originando una respuesta al pH nernstiana. Es conveniente señalar que la introducción de Si_3N_4 sobre el SiO_2 proporciona una interfase que bloquea las cargas[32]. En trabajos posteriores se ubican otras capas para permitir al ISFET ser sensible a otros iones, por ejemplo, PVC conteniendo valinomicina el cual es un material electroactivo sensible a iones usado en electrodos sensible a iones de potasio[33,34].

Las expresiones matemáticas que gobiernan el comportamiento del ISFET son similares a las que presenta el MOSFET (tanto para la tensión de bandas planas como para la tensión umbral) y se puede llegar a ellas considerando al conjunto de elementos (electrodo, electrolito, aislante y semiconductor) que conforman el ISFET como una celda electroquímica.

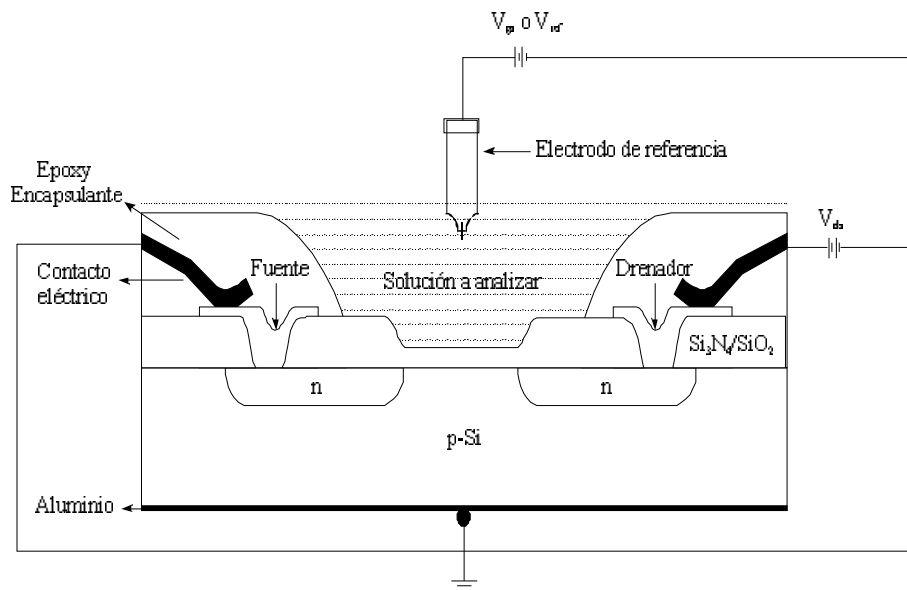


Figura I.1: Esquema de un ISFET con la estructura EOS(Electrolito-oxido-semiconductor)

Consideraremos un ISFET con el óxido de puerta SiO_2 expuesto directamente al electrolito (ver fig. I.1) tendremos las interfases que se muestran esquematizadas en la figura I.2. Por otro lado, tendremos en cuenta que al entrar en contacto fases de diferentes propiedades electroquímicas se genera en la interfase una redistribución de

cargas y potencial hasta lograr el equilibrio definido por la igualdad de los potenciales electroquímicos de los portadores de carga en ambas fases, estableciéndose una interfase con unas propiedades electroquímicas definidas. Por tal razón, se puede estudiar las interfases desde un punto de vista electroquímico considerando que existe equilibrio termodinámico. La celda compuesta por el conjunto de fases que entran en contacto tiene un mecanismo de operación que puede ser descrita por procesos en cada una de las fases y de las interfases.

Las diferentes interfases que aparecen en la denominada celda electroquímica empezando la descripción desde la parte superior del gráfico anterior, son: La primera interfase esta formada por el hilo de cobre con el electrodo de referencia de Ag/AgCl, luego la segunda interfase lo constituyen el electrodo con la solución o electrolito, la tercera interfase esta formada por el electrolito con el aislante SiO₂, el cual forma otra interfase con el semiconductor de silicio y éste en contacto con el hilo de cobre conectado en la parte inferior del sustrato forma la última interfase.

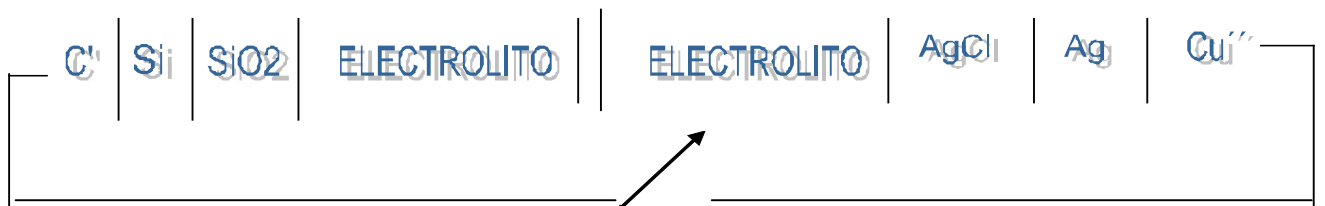


Figura 1.2: Esquema de un ISFET en función de las interfases que se forman

Después que el “switch simbólico” es cerrado en el circuito de la figura 1.2 lo cual equivale a decir que todos los elementos e interfases interactúan, el equilibrio puede ser establecido y se cumple que en todas las interfases las energías electroquímicas son iguales, por lo tanto entre la referencia y el sustrato de silicio se cumple:

$$\bar{\mu}_e^{\text{Ref}} = \bar{\mu}_e^{\text{Si}} \quad 1.4$$

Siendo:

$\bar{\mu}_e^{\text{Ref}}$ Potencial electroquímico del electrodo de referencia

$\bar{\mu}_e^{\text{Si}}$ Potencial electroquímico del semiconductor Silicio

Esta igualdad corresponde a la alineación de los niveles de Fermi en los dos contactos metálicos de cobre interactuantes del sistema. La ecuación anterior se debe aplicar a todas las interfases existentes entre el electrodo de referencia y el sustrato de silicio.

El potencial electroquímico ($\bar{\mu}_j$) de una partícula cargada (iones, electrones o huecos) está definido como el trabajo total que debe realizarse sobre una carga eléctrica para trasladarla desde el infinito y colocarla en la parte interior de la fase material. Este trabajo se descompone en un “trabajo químico” más un “trabajo eléctrico”. El primer trabajo se efectúa considerando una fase material carente de cargas o de capa de dipolos en la superficie, mientras que el trabajo eléctrico es el realizado considerando solamente las cargas y la capa de dipolos. Por lo tanto, el potencial electroquímico $\bar{\mu}_j$ viene a ser la suma del potencial químico (μ_j) y la contribución a la energía mediante el potencial eléctrico del medio (\emptyset):

$$\bar{\mu}_j = \mu_j + z_j q \emptyset \quad 1.5$$

donde:

z_j es la valencia de una partícula j

q es la carga del electrón

Dado que la expresión estadística de Fermi-Dirac también es aplicable para iones en electrólitos (ninguna posición iónica puede ser ocupada por más de un ión) se podría usar también el término energía de Fermi de iones para el potencial electroquímico de iones, por lo tanto tenemos que la energía de Fermi y el potencial electroquímico están relacionados de la siguiente manera:

$$E_F = \bar{\mu}_e \quad 1.6$$

Es conveniente señalar que en función del número de Avogadro, N_A , la expresión anterior toma la forma de: $\bar{\mu}_e = N_A \cdot E_F$.

La igualdad 1.6 es muy importante porque muestra el carácter del sensor químico desde el punto de vista eléctrico y establece la relación entre magnitudes observadas desde el punto de vista electrónico y de la mecánica cuántica. En realidad, el potencial químico de los compuestos estudiados en el ambiente en donde está un material sensible químicamente traduce un cambio de la energía de Fermi (igual al potencial

electroquímico de los electrones) en el conductor metálico externo y este cambio puede ser medido mediante un circuito electrónico externo.

Supongamos que se aplica un potencial externo V_G a la celda electroquímica, exactamente entre los extremos del ISFET (entre los conductores de cobre en contacto con el sustrato de silicio y el electrodo) de tal forma que V_G para iones monovalentes puede expresarse como [35]:

$$V_G = \phi^{Cu''} - \phi^{Cu'} = (1/q) \cdot [\bar{\mu}_e^{Cu'} - \bar{\mu}_e^{Cu''}] \quad 1.7$$

Donde $\phi^{Cu''}$, $\phi^{Cu'}$ son los potenciales electrostáticos en el interior de los conductores de cobre ubicados en los extremos.

A partir de esta expresión y considerando el análisis entre las diferentes interfases en donde influyen las cargas libres mediante un potencial y los dipolos orientados en las superficies interfaciales y tomando en cuenta la analogía con el MOSFET, la tensión umbral de un ISFET será:

$$\begin{aligned} V_T &= V_{bp} + 2\Psi_F - Q_B/C_{ox} \text{ (para un MOSFET)} \\ V_T &= V_{Ref} - \psi_o + \chi^{Sol} - W^{Si}/q - (Q_i + Q_B)/C_{ox} + 2\Psi_F \end{aligned} \quad 1.8$$

Donde:

- V_{Ref} :Potencial del electrodo de referencia
- ψ_o :Caída de potencial en la interfaz aislante/electrolito
- χ^{Sol} :Potencial del dipolo de superficie del electrolito en la interfaz aislante/electrolito
- W^{Si} :Función de trabajo del silicio
- Q_i :Carga efectiva por unidad de área en el aislante y en la interfaz aislante/silicio
- Q_B :Carga en la zona empobrecida del silicio
- C_{ox} :Capacidad del aislante
- Ψ_F :Potencial de Fermi

De los términos que aparecen en la expresión 1.8 el término ψ_o es el parámetro que introduce "la química" debido a que es una función del pH de la solución. Por tanto, observando las expresiones 1.8 de la tensión umbral V_T del MOSFET y del ISFET

puede concluirse que un ISFET es electrónicamente idéntico al MOSFET y por tanto puede ser visto como un dispositivo electrónico con una característica adicional: la posibilidad de modificar químicamente la tensión umbral V_T mediante el potencial interfacial en la interfase electrolito/aislante [31].

I.1.2 MODELO DE LA DOBLE CAPA ELECTRICA

Al entrar en contacto dos materiales de diferente densidad se observa que las fuerzas que operan sobre las partículas en la interfase generan nuevas estructuras con propiedades diferentes que las del seno de la solución. Por lo tanto la ordenación de las partículas depende de las fuerzas que operan sobre ellas apareciendo entonces nuevas estructuras en la interfase de los materiales.

En el caso particular de una interfase formada por un electrolito y un aislante se observará que cuando el electrolito adquiere una carga neta o en exceso, se genera una fuerza eléctrica o campo eléctrico a través del límite material-electrolito presentando la otra fase una carga como respuesta al estímulo del campo que surge del proceso de carga del electrolito. En general, la naturaleza de la respuesta depende de que el material sea un conductor, un semiconductor o un aislante. Pero en cualquiera de los casos siempre hay una respuesta[30]. En conclusión, la presencia de un límite para el electrolito genera una redistribución de las cargas y de los dipolos orientables (en comparación con su distribución en la masa de las fases). Esta redistribución constituye la base estructural de la diferencia de potencial a través de la interfase.

Diferentes modelos han sido propuestos para explicar el fenómeno de distribución de cargas en la interfase. El primero fue propuesto por Helmholtz en 1879 quién suponía que las cargas en ambos lados de la interfase y a distancia mínima se comportaban como en un condensador de placas paralelas. Los resultados experimentales muestran que la capacidad de la doble capa depende de la densidad de carga superficial y por tanto de la concentración de la solución por lo que esta propuesta no fue viable[36].

El modelo actualmente aceptado plantea que en una interfase aislante/líquido los cambios de la caída de potencial ocurren en el aislante por ser la fase en contacto menos conductiva. En la interfase mencionada no tiene lugar ningún transporte de

cargas, generándose una densidad de cargas superficial llamada doble capa eléctrica de Gouy-Chapman-Stern[37]. La caída de potencial de Helmholtz V_H en el aislante no proviene de las cargas libres sino que es determinado por un proceso de adsorción-desorción y no por intercambio de electrones como sucedería sí en vez de aislante se tuviera metal. La razón es que la densidad de cargas en el espacio de cargas del aislante es bastante menor comparado con la densidad que puede estar implicada en la adsorción de, por ejemplo, H^+ o OH^- . De aquí se deduce porque la adsorción de especies iónicas son predominantes, siendo adsorbidos por la superficie del óxido y ubicados en el llamado plano interno de Helmholtz (IHP). En el electrolito se forma la segunda capa en donde se aprecia los iones solvatados formando el plano exterior de Helmholtz (OHP). Más allá de esta zona se ubican las cargas de signo opuesto a la superficie de óxido (zona de carga difusa o de Gouy-Chapman).

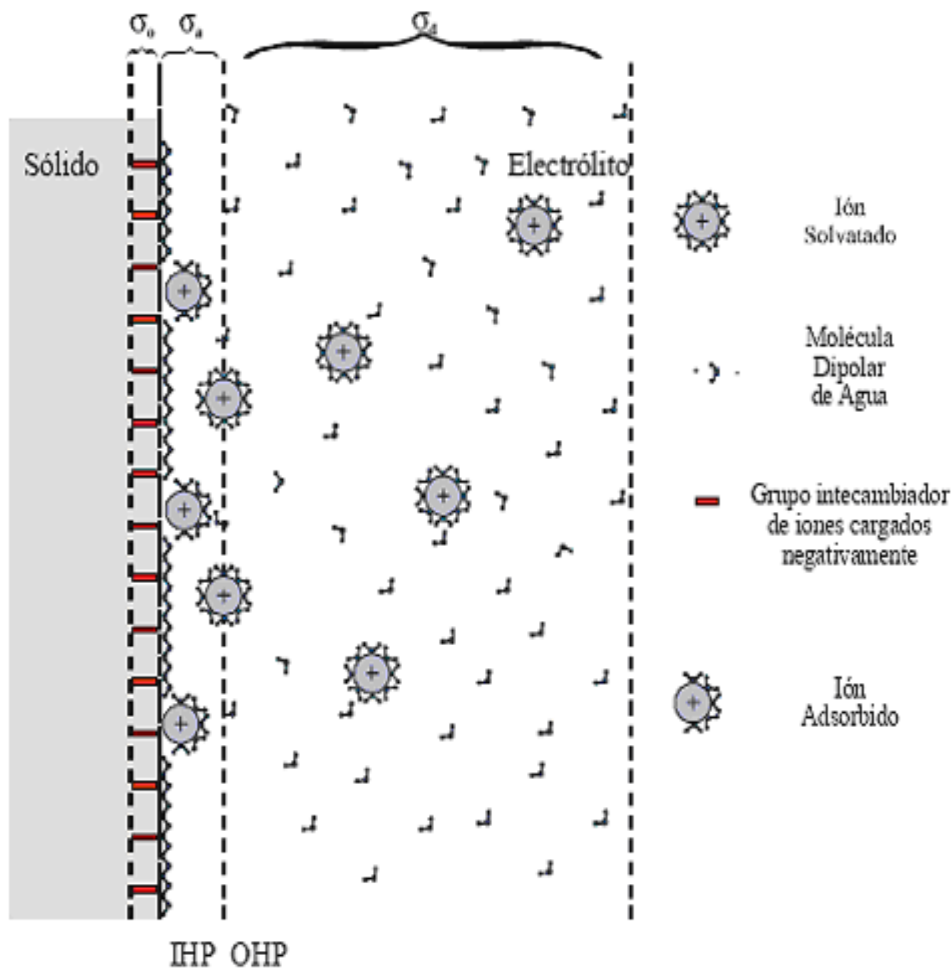


Figura I.3: Doble capa eléctrica, concepción actual

Los trabajos de Yates et al. [28] y posteriormente Bousse et. al [26] resultan importantes porque utilizando las teorías de la doble capa eléctrica y de enlaces locales permiten determinar el potencial en la interfase electrolito/aislante en función de dos parámetros simples. Estos parámetros son, el pH_{pzc} que señala el valor del pH para el cual la superficie del oxido (aislante) es eléctricamente neutra, y β las cuales determinan la sensibilidad final del dispositivo. La expresión para el potencial en la interfaz aislante/electrolito de la expresión 1.8 para valores grandes de β esta dada por:

$$\Psi_a = 2.3 \frac{kT}{q} \frac{\beta}{\beta + 1} (pH_{pzc} - pH) \quad 1.9$$

Esta expresión muestra que para valores de β grandes la respuesta se acerca a la nernstiana y será lineal con el pH. El valor de β puede ser expresado en términos de las constantes de equilibrio de las reacciones que se presentan en la interfase, a nivel superficial en el aislante, en donde la concentración de iones H^+ en la superficie: $[H^+]_s$, es considerada y se encuentra relacionada con la $[H^+]_B$ en el seno de la solución mediante la expresión estadística de Boltzmann:

$$[H^+]_s = [H^+]_B \exp\left[\frac{-q\Psi_0}{kT}\right] \quad 1.10$$

Resultando la expresión general de la sensibilidad al pH del ISFET en:

$$\frac{\partial\Psi_0}{\partial pH_B} = -2.3 \frac{kT}{q} \alpha \quad 1.11$$

Siendo α un parámetro de sensibilidad adimensional que varia entre 0 y 1 y expresada por:

$$\alpha = \frac{1}{(2.3kT/q^2)(C_{dif}/\beta_{int}) + 1} \quad 1.12$$

Donde:

β_{int} es la capacidad intrínseca del buffer de la superficie del aislante que significa la habilidad de la superficie del aislante para dejar o tomar protones.

C_{dif} es el capacidad diferencial de la doble capa eléctrica.

Si $\alpha=1$, el ISFET tiene una sensibilidad nernstiana de 59.16 mV/pH a 298°K significando además la máxima sensibilidad que se puede obtener [35,39].

Finalmente y para efectos prácticos podemos obtener una relación más simple observando las expresiones 1.8 y 1.10 de tal forma que se aprecia que en la primera de las nombradas la tensión umbral depende del potencial eléctrico ψ_0 que aparece en la interfaz aislante/electrolito y de un conjunto de términos que se pueden considerar constantes reunidos en el término K. Lo anterior implica que la tensión umbral es variable y depende de la actividad de los iones (debido a ψ_0) que se encuentran en la solución, por tanto podemos re-escribir la tensión umbral adoptando una expresión análoga a la del potencial de membrana:

$$V_T = K + \frac{0.05916}{q} \log a \quad 1.13$$

Considerando la presencia del electrodo de referencia y su contribución al potencial externo ubicado fuera del electrodo de referencia V_{ext} que finalmente se medirá y con el cual se trabajará para efectos de determinar la actividad o concentración del analito de interés, tendremos la expresión:

$$V_{ext} = K1 + \frac{0.05916}{q} \log a \quad 1.14$$

Esta expresión es sumamente útil para efectos prácticos en las mediciones indirectas de concentraciones de determinados analitos en una sustancia.

REFERENCIAS

1. U. E. Spichiger-Keller; Chemical sensors and biosensors for medical and biological applications, Weinheim, Wiley-VCH, (1998).
2. S. Alegret, M. del Valle, A. Merkoci; Sensores electroquímicos; Col·lecció Materials. Universitat Autònoma de Barcelona, (2004).
3. M. Lambrechts, W. Sansen; Biosensors: Microelectrochemical Devices; Sensors Series; Inst. of Physics Pub.; (1992).
4. J. Janata, M. Josowicz y D. M. Devany; Chemical sensors. Analytical chemistry, 70 (12): p. 179R-208R(1998).
5. J. Janata; Centennial retrospective on chemical sensors. Analytical chemistry, 73(5):p. 150A-153A(2001)
6. T. Hofmann, K. Schroder, J. Zacheja y J. Binder; Fluid characterization using sensor elements based on interdigitated electrodes. Sensors and Actuators B-Chemical, 37(1-2):p. 37-42 (1996).
7. E. Katzy, I. Wilner; Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: Routes to impedimetric immunosensors, DNA Sensors and enzyme biosensors. Electroanalysis. 15(11): p. 913-947. (2003).
8. L. D. Watson, P. Maynard, D. C. Cullen, R. S. Sethi, J. Brettle, C. R. Lowe; A microelectronic conductimetric biosensor; Biosensors Bioelectron., 3 (1987/88) 101.
9. M. Hanss, A. Rey; Application de la conductimétrie à l'étude des réactions enzymatiques, système urée-uréase; Biochim. Biophys. Acta, 227 (1971) 630.
10. S. R. Mikkelsen, G. A. Rechnitz; Conductometric transducers for enzyme-based biosensor; Anal. Chem., 61 (1989) 1737.
11. M. M. Castillo-Ortega, D. E. Rodríguez, J. C. Encinas, M. Plascencia, F. A. Mendez-Velarde y R. Olayo; Conductimetric uric acid and urea biosensor prepared from electroconductive polyaniline(n-butyl metacrylate) composites. Sensors and Actuators 85 (1-2) p:19-25. (2002).
12. A.Q. Contractor, T. N. Sureshkumar, R. Narayanan, S. Sukeerty, R. Lal y R S. Srinivasa; Conducting polimer.based biosensors. Electrochimica acta 39(8-9), p: 1321-1324. (1994).

13. D. R. Thevenot, K. Toth, R. A. Durst y G. S. Wilson; Electrochemical biosensors: recommended definitions and classifications. *Biosensors and Bioelectronics* 16(1-2) p: 121-131. (2001).
14. V. G. Levich; *Physicochemical hydrodynamics*, Prentice Hall Inc., New Jersey, (1962).
15. P. L. Bailey; *Analysis with Ion-selective Electrodes*, Second Edition, London, (1980).
16. Y. Taniy, Y Umezawa; Ion-selective Electrodes, *Sensors Letters* 3(2), p:99-107. (2005).
17. P. Bergveld, Developments of an ion-sensitive solid-state device for neuro-physiological measurements; *IEEE Trans. Biomed. Eng.* BME-17 (1), 70 (1970).
18. L. Moreno, A. Merlos, N. Abramova, C. Jiménez y A. Bratov; Multi-sensor array used as an “electronic tongue” for mineral water analysis. *Sensors and Actuators B Chemical*. ISOEN2005 Selected papers from the 11th International Symposium on Olfaction and Electronic Noses, Barcelona-Spain. 116(1-2)p: 130-134. (2006).
19. Wojciech Wroblewski; <http://csrg.ch.pw.edu.pl/tutorials/ise/>; 2005
20. S. Middelhoek; Celebration of the tenth transducers conference: The past, present and future of transducer research and development; *Sensors and Actuators A Physical*, vol. 82, n° 1-3, (2000) , p. 2-23.
21. N. Zine; Tesis doctoral; Universidad Autónoma de Barcelona, (2005).
22. P. Bergveld, A. Sibbald, *Analytical and Biomedical Applications of ISFETs*, Elsevier, Science Publishers B.V. Amsterdam, (1988).
23. H. Abe, M. Esashi, T. Matsuo, ISFETs using inorganic gate thin films. *IEEE Transactions on Electron Devices*, Vol. Ed-26, No. 12, (1979).
24. J. C. Chou, J. L. Chiang Study on the amorphous tungsten trioxide ion-sensitive field effect transistor; *Sensors and Actuator B Chemical*, vol 7, n° 1-3, (2000), p. 106-108.
25. T. Matsuo, M. Esashi, *Methods of ISFET fabrication*, *Sensors and Actuators* vol. 1, n° 1, p. 77-96, (1981) .
26. L. Bousse, N. F. DeRooij, P. Bergveld; Operation of chemically sensitive field-effect sensors, as a function of the insulator-electrolyte interface; *IEEE Transactions on Electron Devices*, vol. 30, n ° 10, p.1263-1270, (1983).
27. J. L. Diot, J. Joseph, J. R. Martin, P. Clechet; pH-dependence of the Si/SiO₂ interface state density for EOS systems, quasic-static and AC conductance methods; *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 193, n° 1-2, p. 75-88, (1985).

28. D. E. Yates, S. Levine, T. W. Healy; Site-binding model of the electrical double layer at the oxide-water interface; *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions 1*, vol. 70, (1974), p. 1807-1818.
29. W. M. Siu, R. S. C. Cobbold; Basic properties of the electrolyte-SiO₂-Si system: physical and theoretical aspects; *IEEE Transactions on Electron Devices*, vol. 26, n° 11, (1979) p.1805-1815.
30. T. Akiyama, y. Ujihira, Y. Okabe, T. Sugano, E. Niki, Ion-sensitive Field Effect Transistor with inorganic gate oxide for pH sensing, *IEEE Transactions on Electron devices*, vol. 29, n° 12, (1982) p. 1936-1941.
31. D. L. Harame, L. J. Bousse, J. D. M eindl; Ion-sensing devices with silicon nitride and borosilicate glass insulators; *IEEE Transactions on Electron Devices*, vol. 34, n° 8, (1987) p.1700-1707.
32. A. Covington, P. D. Whalley; Recent Advances in Microelectronic Ion-sensitive Devices (ISFETs). The Operational transducer. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, (1986), 82, p. 1209-1215.
33. J. Janata, R. Huber; *Ion-selective Electrodes in Analytical Chemistry*, ed. H. Freiser (Plenum, New York, 1981), vol. 2.
34. A. Sibbad, A. K. Covington, R. F. Carter; *Med. Biol. Eng. Comput.* (1985), 23, 329.
35. Van der Berg, B. Van der Schoot, H. Van den Vlekkert, Ion-sensitive Field Effect Transistor, in Gopel, J. Hesse, J. N. Zemel, *Sensors, Volume 2: Chemical and Biochemical Sensors*, pp. 469-527, VCH, Weinheim (1991).
36. P. Bergveld; Thirty years of ISFETOLOGY. What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years; *Sensors and Actuators B* 88 (2003) 1-20.
37. J. O'M. Bockris, A. K. N. Reddy; *Electroquímica Moderna vols. 1 y 2*. Ed. Reverte (1980).
38. J. M. Costa, *Fundamentos de Electrónica. Cinética electroquímica y sus aplicaciones*. Ed. Alhambra. (1981).
39. P. Bergveld; ISFET, Theory and Practice; *IEEE Sensor Conference Toronto*, (2003).

CAPITULO II: BIOSENSORES

II. BIOSENSORES

Un biosensor está definido como “un dispositivo analítico que utiliza un material sensible biológicamente para detectar especies químicas o biológicas sin la necesidad de procesamiento complejo de las muestras”. Usualmente este material sensible biológicamente se encuentra en contacto con un transductor quién convierte la respuesta bioquímica en una señal eléctrica cuantificable[1].

Un biosensor en forma general puede verse (figura II.1) como un dispositivo analítico formado por dos componentes fundamentales: Un Receptor (B, capa bioactiva) y un Transductor, T. Aparte y complementando el trabajo del dispositivo se tiene el amplificador A y el registrador de señales, R.

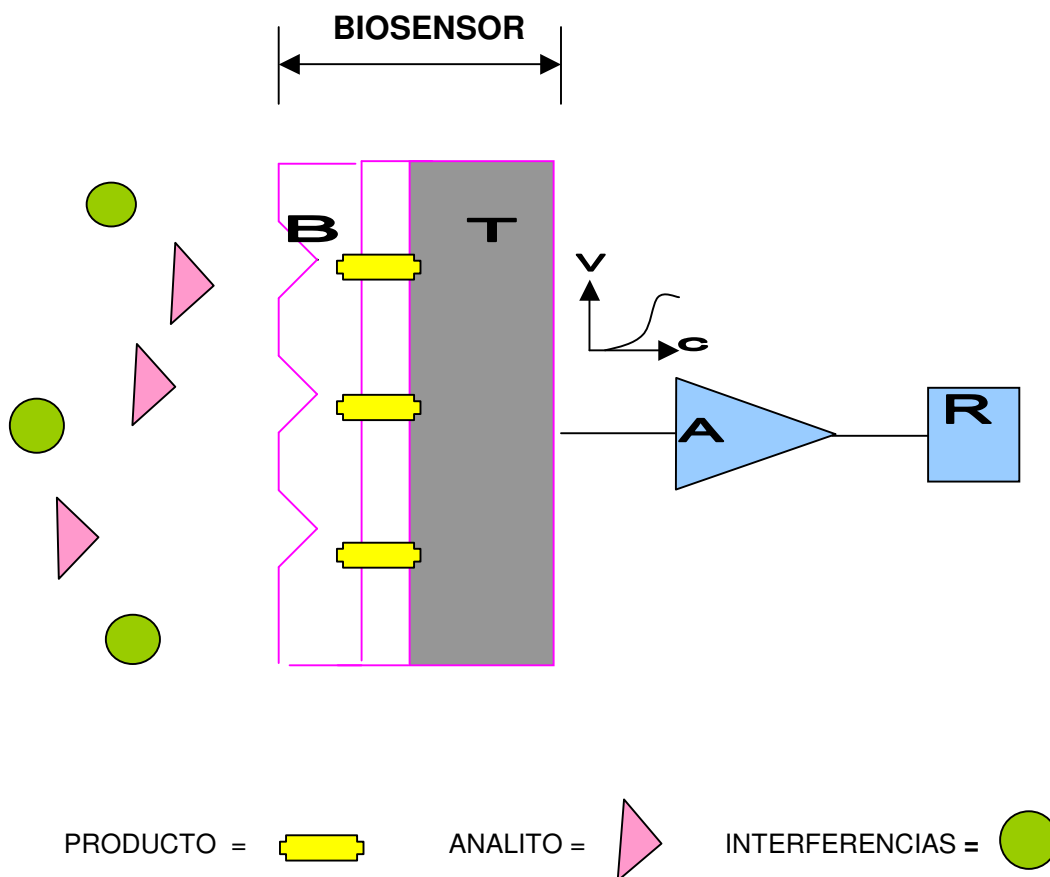


Figura II.1: Partes de un biosensor; B, Capa bioactiva conteniendo las moléculas de reconocimiento; T, Transductor. Complementando al biosensor: A, Amplificador; R, Registrador

El receptor ó elemento de reconocimiento biológico puede ser: ácido nucleico, enzima, anticuerpo, receptor, tejido, célula y si es de naturaleza biomimético puede ser: Polímero de impresión molecular (PIM), aptámeros, Ácidos nucleicos peptídicos (PNAs)

El principio de detección de un biosensor se basa en la interacción específica entre el compuesto o microorganismo de interés (analito o sustrato) y el receptor ó elemento de reconocimiento. Como resultado de esta unión se produce la variación de una o varias propiedades físico-químicas (pH, transferencia de electrones, de calor, cambio de potencial, de masa, variación de las propiedades ópticas, etc) que detecta el transductor[2]. Este sistema transforma la respuesta del elemento de reconocimiento en una señal eléctrica indicativa de la presencia del analito sometido a estudio o proporcional a su concentración en la muestra.

Los biosensores pueden clasificarse atendiendo a diferentes criterios, como por ejemplo:

- a. El tipo de interacción que se establece entre el elemento de reconocimiento y el analito, pudiendo ser de tipo biocatalíticos o por bioafinidad.
- b. El método utilizado para detectar dicha interacción. En este caso puede ser directa o indirecta.
- c. La naturaleza del elemento de reconocimiento. Podemos citar las enzimas, tejido, orgánulo, célula, anticuerpo, ácido nucleico, PIM, PNA.
- d. El sistema de transducción. De acuerdo a este criterio se tiene: electroquímicos, ópticos, gravimétricos, térmicos, nanomecánico.

En función de los dos últimos criterios descritos se tienen también algunas clasificaciones particulares[3-6] pero esto siempre estará en función de la naturaleza del elemento de reconocimiento que puede ser de diverso tipo y de allí estas clasificaciones.

II.1 BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS

Este tipo de biosensores presentan un elemento biológico como receptor y logran combinar el poder analítico de los transductores electroquímicos y la selectividad del elemento biológico.

II.1.1 BIOSENSORES ENZIMATICOS

Son aquellos biosensores cuyo elemento biológico o biorreceptor es una enzima. La transducción electroquímica es muy adecuada para este tipo de biosensores por su acoplamiento y debido a las propiedades generales que presentan las enzimas. La enzima a utilizarse en el biosensor debe reaccionar de manera específica con el analito que se desea estudiar. Al interaccionar enzima-analito se produce la reacción química generándose productos que son de inmediato detectados por el biosensor enzimático.

II.1.1.1 BIOSENSORES POTENCIOMETRICOS

Este tipo de biosensores generalmente integra material enzimático con electrodos selectivos de iones o electrodos potenciométricos de gases. Las enzimas utilizadas, hidrolasas o de otro tipo, generan productos de reacción idóneos para ser detectados por este tipo de electrodos y estos suelen ser: H^+ , NH_4^+ , NH_3 , CO_2 , CN , etc[8].

II.1.1.1.1 ENZIMA

Las enzimas son proteínas desarrolladas por las células de los organismos vivos con la función específica de catalizar reacciones químicas[7]. Las enzimas que participan en reacciones químicas incrementan la velocidad que permite alcanzar el equilibrio, estando la velocidad definida como el cambio en la cantidad (moles, gramos) de reactivos o de productos por unidad de tiempo.

Una enzima puede unirse temporalmente a la molécula que se está transformando (conocida como sustrato) durante los pasos intermedios de la reacción, pero al final la enzima se regenera en su forma original mientras se libera el producto de la reacción.

Las enzimas tienen propiedades excelentes con respecto al sustrato traducidos en la capacidad de reconocer muy selectivamente las estructuras moleculares y de formar con ellas estructuras más complejas del tipo enzima-sustrato. Lo anterior se denomina “especificidad de la enzima” y aparece en su estructura proteica, incluso para aquellas enzimas que para ser activas catalíticamente deben estar asociadas con moléculas pequeñas, orgánicas o inorgánicas, llamadas Cofactores. Las moléculas orgánicas que tienen función de cofactor pueden estar unidas permanentemente (grupo prostético) o no (coenzima) al resto de la molécula enzimática. La especificidad de la enzima reside en una región determinada de la superficie enzimática denominada “Centro de Fijación del Sustrato” que es un ordenamiento de los grupos funcionales en la superficie de la enzima especialmente dispuestos para fijar un sustrato específico[7]. En conclusión, las enzimas combinan el reconocimiento molecular con la transformación molecular.

Desafortunadamente, muy pocas enzimas pueden describirse mediante su estructura molecular. Por ahora, cada enzima se identifica y caracteriza por su efecto catalítico en una o más reacciones químicas.

A continuación citamos las propiedades generales de las enzimas que resultan ser las “ventajas” de su uso como elementos de reconocimiento molecular en el desarrollo de biosensores y, en particular, de los de tipo electroquímico[8]:

- a. Alta selectividad para un sustrato (o familias de sustratos).
- b. Mecanismo de acción bien caracterizado.
- c. Mecanismo catalítico rápido y sensible, amplificador de la señal.
- d. Posibilidad de integración a distintos modos de transducción.
- e. Posibilidad de transducción directa y continua.
- f. Disponibilidad de materiales enzimáticos de distinta clase, origen, actividad y estabilidad.
- g. Posibilidad de determinar grupos de sustancias mediante enzimas selectivas a dichos grupos o mediante la inhibición enzimática que producen determinados grupos sobre algunas enzimas.
- h. Procedimientos de inmovilización bien establecidos.
- i. Reutilizables.
- j. Precio moderado
- k. Producción masiva.

II.1.1.1.2 CATALISIS

La catálisis es un proceso en el que aumenta la velocidad a la que una reacción se aproxima al equilibrio. Esta velocidad está en función de la energía libre de activación G ; lo que significa que un catalizador disminuye esta barrera cinética[9].

Un catalizador por tanto, tiene como función disminuir la energía inicial necesaria para que una reacción química se produzca, se caracteriza porque acelera una reacción química sin cambiar su magnitud y se puede recuperar inalterado químicamente entre los productos finales de la reacción. Por tanto los cambios en las funciones termodinámicas de estado (energía libre, G ; entalpía, H ; entropía, S) características de una reacción, no están afectadas por la catálisis. Esto significa que una reacción químicamente reversible alcanza el mismo equilibrio en presencia o ausencia de un catalizador, aunque la reacción catalizada alcanzará este equilibrio mucho más rápidamente a la misma temperatura[10].

Para el desarrollo de una reacción enzimática, primero debe establecerse la interacción entre enzima y sustrato, lo cual requiere el acercamiento de este último al "Centro Activo" de la enzima y el alineamiento correcto del sustrato con respecto a dicho centro para que se produzca el ajuste inducido. El Centro Activo de la enzima es una región tridimensional donde se une el sustrato (y el cofactor si participa) y esta formada por un clúster de grupos funcionales que determinan la afinidad, la especificidad y la capacidad de transformación química del sustrato en producto de la reacción, para tal efecto se menciona que en el Centro activo existe un sitio de enlace del sustrato o Centro de Fijación del Sustrato y otro denominado el "Sitio Catalítico" que está formado por las cadenas laterales de los aminoácidos involucrados directamente en el proceso catalítico[11].

Al acercarse el sustrato al centro activo de la enzima se produce un cambio de conformación en éste originando el complejo enzima-sustrato en el cual los dos están unidos mediante enlaces covalentes o no-covalentes (enlaces electrostáticos, hidrofóbicos, de Van der Waals, puentes de hidrógeno, etc). Seguidamente sucede la reacción catalítica, en el cual esta involucrado el sitio catalítico y en la que el sustrato se modifica por diferentes mecanismos. El último paso de la reacción es el desprendimiento consistente en que el sustrato modificado, o sea el producto de la

reacción, se desprende del centro activo y, en consecuencia, el centro activo de la enzima vuelve a asumir la conformación que tenía antes de la interacción con el sustrato, sin sufrir ninguna otra modificación. La enzima puede entonces interactuar del mismo modo con una nueva molécula del sustrato[11].

Existen diferentes tipos de enzimas , clasificados según la reacción que llevan a cabo[12]:

- a. Transferasas: catalizan la transferencia de un grupo químico, de un sustrato a otro.
- b. Hidrolasas: catalizan reacciones de hidrólisis.
- c. Liasas: catalizan adiciones de grupos a dobles enlaces o formaciones de dobles enlaces por eliminación de grupos.
- d. Isomerasas: catalizan la interconversión de isómeros.
- e. Ligasas: catalizan la formación de enlaces C-C, C-S, C-N, C-O por reacciones de condensación acopladas a la hidrólisis de ATP.
- f. Oxidoreductasas, catalizan reacciones de oxidorreducción, es decir, transferencia de hidrógeno o electrones de un sustrato a otro.

II.1.1.1.3 CINÉTICA ENZIMÁTICA

La cinética es el estudio de la velocidad de cambio entre el estado inicial de los reactivos y productos y su estado final[9].

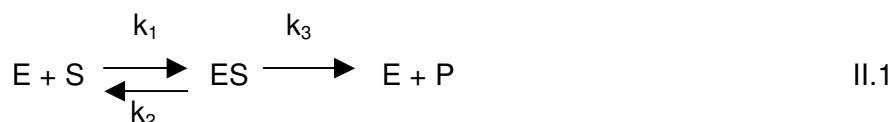
Los estudios del comportamiento cinético de las reacciones catalizadas por enzimas se dirigen normalmente hacia la elucidación de sus mecanismos, con la intención de revelar la forma y secuencia con que la enzima se combina con su sustrato y libera los diversos productos de la reacción.

Los factores más destacados, que pueden alterar la velocidad de una reacción catalizada por una enzima, son: la concentración de la enzima, del sustrato, del complejo enzima-sustrato (ES), del producto o de inhibidores y activadores, así como la fuerza iónica, la temperatura y el pH del medio en el cual se realiza la reacción.

A una concentración constante de enzima, la velocidad de reacción se incrementa con el aumento de la concentración de sustrato, hasta alcanzar un máximo. Esto significa que los sitios catalíticos de la enzima se saturan y la reacción alcanza su velocidad

máxima. Cuando todos los sitios están ocupados por sustrato se puede hablar de Saturación y es posible explicar el tipo de cinética de acuerdo a lo descrito en 1913 por Michaelis y Menten, quienes consideran que sólo un sustrato y un producto son libremente interconvertibles.

La reacción enzimática general representada por el mecanismo de Michaelis y Menten:



Para expresar la ecuación de la velocidad inicial v , en términos de magnitudes conocidas, como $[S]$ y $[E]_0$ (concentración estequiométrica total de los centros activos, siendo $[E]_0 = [E] + [ES]$), se aplica el concepto de estado estacionario. Al cabo de algunos ms de mezclar E y S, la velocidad de formación de ES ($k_1 [E][S]$) se iguala a la velocidad de descomposición de ES ($(k_2 + k_3)[ES]$). De esta forma, la concentración del complejo $[ES]$ se mantiene constante en el tiempo[8]. Por tanto se obtiene:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{II.2}$$

Esta es la ecuación de MICHAELIS-MENTEN donde:

$V_{\max} = k_3[E]_0$ es la máxima velocidad de la reacción,
 $[S]$ la concentración del sustrato y
 $K_m = (k_2 + k_3) / k_1$ la constante de Michaelis-Menten.

El valor K_m de una enzima generalmente se encuentra comprendido en el rango (10^{-1} a $10^{-6}M$); cuanto más pequeño es, implica que la enzima tiene mayor afinidad por su sustrato y por lo tanto, su unión es más fuerte.

Por otro lado, la velocidad de la reacción v , depende de varios factores siendo los más destacables:

a. Concentración del sustrato: La variación de la velocidad de la reacción debido a la concentración del sustrato se aprecia en la figura II.2, en ella se puede observar que para valores pequeños de concentración de sustrato, $[S] \ll K_m$, la velocidad de la

reacción v es directamente proporcional a la concentración del sustrato (reacción de primer orden), pero para valores grandes de $[S]$ ($[S] \gg K_m$) la velocidad tiende a un máximo de V_{max} , la reacción es de orden cero, independiente de la concentración real del sustrato, solo depende de la actividad de la enzima (todos los centros activos están ocupados por S , es decir $[ES] = [E]_0$); y de esta manera se explica el fenómeno de saturación. La constante de Michaelis corresponde a la concentración de sustrato en que $v = V_{max}/2$.

b. Fenómenos de difusión: La interacción entre la enzima y el sustrato constituye una condición necesaria para que se produzca la reacción considerando la enzima inmovilizada sobre la superficie o en el interior de una membrana. Para que se produzca la interacción, la molécula del sustrato, debe desplazarse hasta la superficie de la membrana que contiene la enzima y posteriormente difundirse hacia su interior. En consecuencia, los fenómenos de difusión, tanto del sustrato hacia la membrana (difusión externa) como en el interior de la misma (difusión interna) influyen en la velocidad global del proceso.

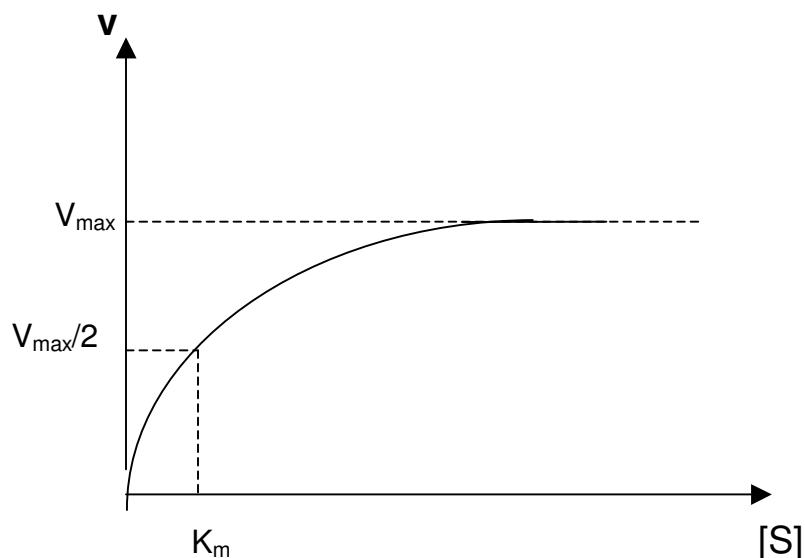


Figura II.2: Representación gráfica de la velocidad de la reacción en función de la concentración de sustrato $[S]$, para una reacción catalizada por enzima.

Sobre la actividad enzimática es necesario considerar dos factores:

a. Efecto del pH: Una enzima es catalíticamente activa en un rango de pH y siendo máxima su actividad a un determinado valor denominado pH óptimo (ver figura II.3). Este valor depende de la composición del medio, la temperatura y la estabilidad de

la enzima en el medio. En todas las reacciones enzimáticas, la velocidad de la reacción aumenta con la temperatura. El descenso en actividad catalítica a ambos lados del pH óptimo puede deberse en parte a la desnaturalización irreversible de la proteína enzimática. Los restantes efectos reversibles de los cambios de pH sobre la velocidad de una reacción catalizada por enzima y con un solo sustrato se pueden atribuir principalmente a la ionización dependiente del pH de aquellos grupos ácidos y básicos de la enzima y su sustrato que intervienen en la formación del complejo ES y de otros grupos disociables que intervienen en la descomposición del complejo.

b. **Inhibidores de la actividad enzimática:** Los “inhibidores” son compuestos que al combinarse con enzimas pueden anular parcial o totalmente la capacidad catalítica de éstas. Pueden actuar combinándose con sustratos, cofactores o diversas formas de una enzima. Algunos de estos compuestos están limitados en su efecto inhibitorio a una única enzima; otros, afectan a un gran número de enzimas que realizan funciones catalíticas muy diferentes.

Los inhibidores pueden ser clasificados de acuerdo a su actuación en irreversibles y reversibles. Un inhibidor irreversible reacciona con una enzima generando un complejo no disociable, quedando la enzima inactivada.



Tales inhibiciones irreversibles deben distinguirse de la inactivación destructiva de la molécula enzimática causada por la desnaturalización general o localizada del lugar activo o por la degradación química.

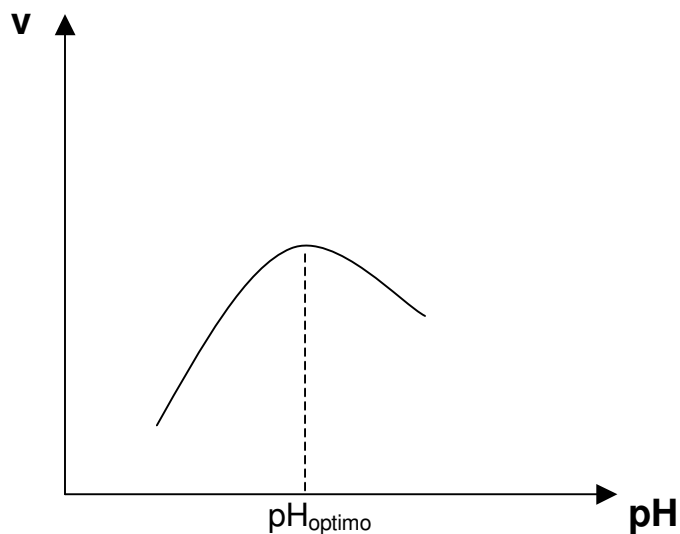


Figura II.3. Efecto del pH en la velocidad de las reacciones enzimáticas

Por otro lado, un inhibidor reversible es aquel que reacciona reversiblemente con la enzima E.



Esto significa que la inhibición reversible no es progresiva, en el sentido de que no continua hasta que todos los lugares susceptibles de la enzima enlazan el inhibidor. En este caso, el grado de inhibición está relacionado con la concentración del inhibidor [I] y con la constante de equilibrio de la reacción (k).

II.1.1.1.4 INMOVILIZACION DE LAS ENZIMAS

Inmovilizar una enzima significa adecuarla, mediante tratamiento químico, físico o mixto, para la interacción con el sustrato buscando la mejor manera de fijarlo al transductor, siendo este aspecto fundamental para la obtención de un biosensor. Por lo tanto, la enzima tiene que ser inmovilizada en una membrana siendo las características de ésta, de importancia crítica para la funcionalidad del sensor[13].

En la inmovilización de los componentes biológicos (enzima, cofactores, microorganismos, lectinas, anticuerpos, liposomas, tejidos, organelos) y con la finalidad de mejorar la adherencia, suele existir un tratamiento previo de la superficie sobre la que se instalarán; este pre-tratamiento puede consistir en un procedimiento de Silanización consistente en la introducción de grupos químicamente reactivos que permiten el enlace del elemento biológico con el transductor[14-22].

Se fijan ciertas consideraciones para trabajar en la inmovilización de los componentes biológicos:

1. El componente biológico debe tener un alto grado de especificidad.
2. La muestra de trabajo debe presentar buena estabilidad con la temperatura, fuerza iónica, pH, potencial redox y composición química. No trabajar en condiciones extremas.
3. Estudiar el dispositivo integrado o dispositivos que se utilizarán para limitar la contaminación, la degradación biológica del componente biológico y/o su modo de acoplamiento. La superficie activa del transductor debe ser adecuadamente tratada.

4. Reproducibilidad y simplicidad de los métodos de inmovilización con la finalidad de elaborar biosensores en serie.

El aspecto más importante que deben satisfacer los componentes biológicos inmovilizados, consiste en mantener su actividad y estabilidad cuando son ubicados en la membrana sobre el transductor.

Las ventajas que se busca con la inmovilización son:

1. Capacitar al componente biológicamente activo para operar en un rango de pH más amplio que el de la solución o en un rango diferente.
2. Obtención de una mayor estabilidad.
3. Capacidad de interactuar con su co-enzima para un mejor rendimiento.
4. Capacidad para co-inmovilizar más de un componente activo biológicamente.

En la figura II.4, se muestra una clasificación de los métodos de inmovilización[23-27].

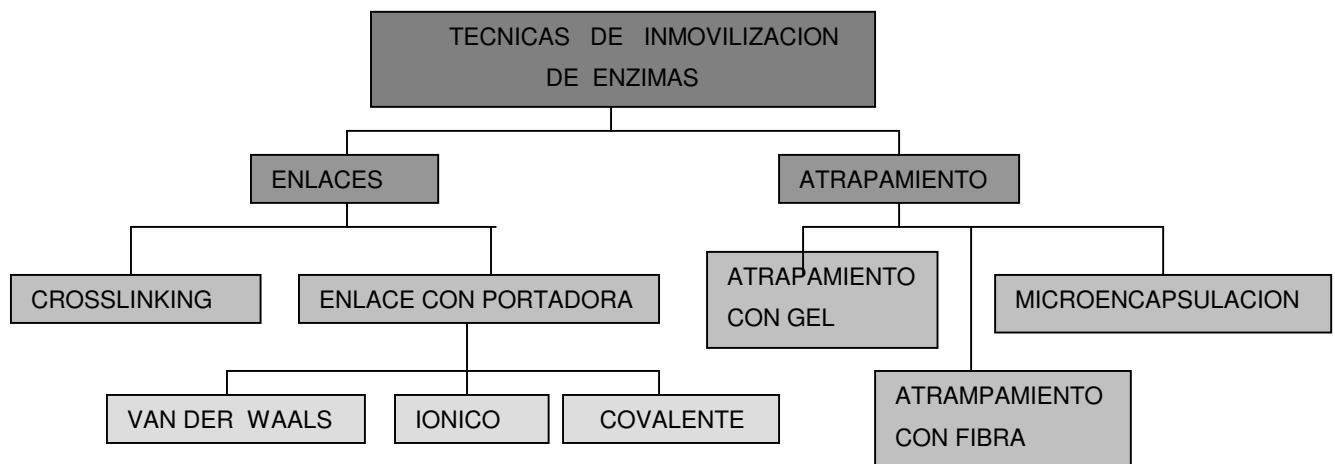


Figura II.4: Clasificación de los métodos de inmovilización de enzima.

Las características más relevantes de los métodos de inmovilización son:

1. CROSSLINKING: Esta técnica consiste en obtener una capa de enzima insoluble en agua a partir de una unión intermolecular de las moléculas de la enzima en ausencia de un portador. Se suele utilizar un reactivo bifuncional tal como el glutaraldehído que enlaza la enzima al transductor y estabiliza las enzimas adsorvidas.

Es muy importante que sean enlazados solamente grupos funcionales de la enzima que no participan en la reacción catalítica. Este método de inmovilización es irreversible, resistente a altas temperaturas y a valores altos de pH. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en la estabilización de enzimas[28].

2. ENLACE POR FUERZAS DE VAN DER WAALS: Este es el método más elemental y consiste en la adsorción de enzima sobre un portador mediante fuerzas de Van der Waals. Esta adsorción es realizada mediante la adición de una solución enzimática al portador, de inmediato se procede a lavar y eliminar la enzima no adsorvida. Este enlace es reversible y no específico estando influenciado por una amplia variedad de parámetros.

3. ENLACE IONICO: En este método se necesita un portador con residuos de material intercambiador de iones. Se forma un enlace iónico entre el portador y la enzima bajo condiciones bien definidas. Este tipo de enlace es más intenso que el de Van der Waals, pero igualmente es reversible.

4. ENLACE COVALENTE: La metodología del enlace covalente entre el transductor y la enzima se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas. De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de estos enlaces son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina, y la histidina y en menor medida la metionina, la triptófana, la arginina y los ácidos aspártico y glutámico. El resto de aminoácidos, por su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, y no pueden intervenir en la unión covalente[29].

5. ATRAPAMIENTO CON GEL: En este caso la molécula enzimática es atrapada en una matriz de tipo gel como por ejemplo, celulosa, colágeno, o polyacrylamide. Para evitar la lixiviación de la enzima fuera de la matriz gel este método se puede combinar con una etapa de crosslinking químico. También se suelen usar hidrogeles [30] como poly(2-hidroxyetil metacrilato) (poly(HEMA)).

6. ATRAPAMIENTO CON FIBRA: Las enzimas también pueden ser atrapadas en fibras huecas con una pared semi-permeable. En procesos industriales se usan para este propósito las fibras de acetato y celulosa.

7. MICROENCAPSULACION: En este método se encapsulan gotitas de solución enzimática en microcapsulas semipermeables realizadas de polímeros orgánicos. El sustrato y los productos de la reacción tienen que difundirse a través de la pared de las microcapsulas. Este método permite que el material biológico esté en contacto directo con el transductor, manteniendo, a su vez, la alta selectividad de las enzimas puesto que no se ven afectadas por los cambios de pH, temperatura y fuerza iónica en el medio[29].

La Tabla II.1 muestra algunos ejemplos de inmovilización de enzimas.

ENZIMA	METODO DE INMOVILIZACION DE LA ENZIMA
L-Lysine oxidasa	Atrapamiento tipo gel [31]
D-Glucosa oxidasa	Cross-linking, usando glutaraldehído con BSA sobre platino [32]
Ureasa	Dip coating, ureasa inmovilizada en membrana diamine etileno o polylysine [33]
Luciferasa y FMN-óxido reductasa	Atrapamiento gel. Co-inmovilización sobre una tira de colágeno activado[34]
Glucosa oxidasa	Co-inmovilización de la enzima sobre fibra de nylon con aceptor de electrones ferricyanide[35]
Alcohol oxidasa	Microencapsulación. Enzima inmovilizada sobre una membrana de policarbonato poroso[36].

TABLA II.1: Enzimas y los métodos de inmovilización utilizados

Existen diferentes técnicas para la deposición de membranas con la enzima inmovilizada sobre superficies que las soportarán, entre las cuales citamos:

1. DIP COATING y CASTING: La forma simple de aplicar una membrana al transductor es el método del “dip coating”. Este método consiste en introducir el sensor ya “armado” en una solución de la membrana. Una membrana delgada se formará sobre la superficie del sensor al evaporarse el solvente. Desafortunadamente estas membranas no presentan una buena uniformidad y reproducibilidad.

El método "casting" es similar y consiste en la aplicación de una cantidad dada de la membrana disuelta sobre la superficie del transductor "armado" u oblea usando por ejemplo, una micropipeta.

Ambos métodos tienen serias desventajas, por ejemplo no son apropiadas para producciones en serie debido a la pobre uniformidad y reproducibilidad. Estas técnicas no son muy recomendables. Sin embargo dada su simplicidad son muy usadas.

2. FOTOLITOGRAFIA: Esta técnica es ideal para las membranas por la capacidad inherente de modelamiento que tiene la fotolitografía. Técnicas tales como el "spinning", exposición de UV y el desarrollo de materiales fotosensibles son muy utilizadas y conocidas por su bajo coste, y facilidad para la producción en masa haciendo de la fotolitografía una técnica aplicable a las membranas enzimáticas.

La forma más simple es la desactivación de regiones específicas en una membrana cubierta la cual recibe los rayos UV. Este método fué utilizado por Kuriyama et al. [16] para la fabricación de un sensor de urea usando un FET diferencial.

3. LIFT-OFF: Esta técnica fué usada en 1986 para la formación de una membrana de glucosa oxidasa basada en una matriz de BSA(Bovine serum albumin)[16]. Para la adhesión de la membrana a la superficie de silicio se realiza un pre-tratamiento de la superficie consistente en la silanización. Después de la adición de glutaraldehido a la solución de BSA se forma un gel, siendo muy importante la viscosidad y el tiempo de formación del gel para la preparación de la membrana, prefiriéndose los tiempos cortos en la formación del gel dependiendo de las concentraciones de la enzima y del glutaraldehido; en altas concentraciones, se observa que el gel se forma muy rápidamente; a bajas concentraciones de enzima y glutaraldehido no se forma capa gel.

4. PLASMA ETCHING: El método del grabado por plasma consiste en la acción combinada de bombardeo de iones y especies reactivas en gas plasma. La selectividad y velocidad de grabado están principalmente definidos por la composición del gas. Algunos ejemplos son: CF_4 y C_2F_6 para el SiO_2 o Si_3N_4

5. SCREEN PRINTING: En principio se trata de una técnica universal para cobertura selectiva de superficies planas. Esta técnica consiste en la aplicación de una pasta a través de aberturas en una pantalla sobre la superficie plana.

6. INK-JET PRINTING: Esta técnica se basa en el mismo principio de las impresoras ink-jet de los ordenadores. Consiste en colocar la solución química que irá en la membrana en un inyector y desde allí se gotea la solución (gotas de 50 micras de diámetro) sobre la oblea[15].

II.1.1.1.5 INFLUENCIA DE LA INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

Durante el proceso de inmovilización, la enzima puede sufrir alteraciones que influyen en la velocidad de la reacción catalítica. Estas pueden ser[37,38]:

1. Cambios en la conformación de la enzima originado por la inmovilización y que se traducen en una disminución de la afinidad hacia el sustrato lo que puede significar inactivación parcial o total de las moléculas enzimáticas, observándose una disminución en la V_{max} .
2. Las interacciones entre la enzima y la matriz pueden originar cambios en los valores de K_m y V_{max} . Esencialmente, aquellos efectos reversibles son mayormente causados debido a variaciones en el equilibrio de disociación de grupos cargados en el centro activo.
3. Una distribución no uniforme de enzima en la matriz afecta las constantes cinéticas medidas.
4. La buena adecuación de la enzima inmovilizada en el transductor permitirá que las moléculas del sustrato alcancen con cierta rapidez a la membrana del sistema biosensor mediante convección y difusión permitiendo actuar al transductor con la rapidez adecuada.

II.1.1.2 EL EnFET

Los EnFETs (Enzyme modified Field Effect Transistor) son biosensores cuyo transductor es un ISFET y el receptor o elemento de reconocimiento son las enzimas inmovilizadas y ubicadas en membranas que se colocan sobre el aislante del ISFET que generalmente es nitruro de silicio.

En 1976, Janata y Moss[39] sugirieron la posibilidad de diseñar un ISFET con una enzima publicándose los primeros resultados recién en 1980 por Caras y Janata[40] en donde se mostraba un dispositivo sensible a la penicilina. Este dispositivo estaba formado por dos ISFETs, uno de ellos tenía en su puerta (aislante) una membrana en donde aparecían enlazados (crosslinked) albumina y penicilinasas mientras que en el otro ISFET solamente aparecía la albumina. Cuando la penicilina aparecía en la sustancia o solución, la enzima penicilinasas ubicada en uno de los ISFETs, catalizaba la hidrólisis de la penicilina hacia ácido penicilinoico. Los protones liberados causaron una disminución en el valor del pH local cerca de la puerta del ISFET originándose una señal de salida del ISFET. El segundo ISFET permaneció inafecto debido a que la membrana que llevaba no contenía enzima alguna, por lo tanto este ISFET operaba como un dispositivo de referencia, denominado REFET. Los dos ISFETs utilizados de esta manera conformaban un sistema para medición diferencial que reportó ventajas importantes como la relativa insensibilidad a efectos térmicos y variaciones del pH en el analito. Igualmente se reportó que era necesario cantidades muy pequeñas de enzima y que la fijación de la enzima puede ser muy buena no necesiándose cambiarse frecuentemente.

Las ventajas que exponen los EnFETs respecto a los sensores tradicionales de enzimas radican fundamentalmente en su respuesta rápida, sus dimensiones, baja impedancia de salida, fijación de la membrana y el diseño de sensores duales para mediciones diferenciales fáciles y prácticas.

II.1.1.2.1 PRINCIPIO DE FUNCIONAMIENTO DE LOS EnFETs

Al observar el EnFET de la figura II.5, podemos señalar que cuando el EnFET, mediante la membrana enzimática, entra en contacto con la sustancia, el sustrato se acerca al Centro Activo de la enzima generándose un ajuste inducido consistente en la unión del sustrato a su sitio de enlace en la enzima, formándose de esta manera el complejo ENZIMA-SUSTRATO (ES); seguidamente sucede la reacción catalítica en donde el sustrato es modificado generándose una caída en el gradiente de la concentración en los lugares donde se produce la modificación química. El último paso de la reacción es el desprendimiento, en donde el sustrato modificado, esto es, el producto generado o reactante consumido es controlado por el ISFET que compone al dispositivo. En el caso, donde el producto generado es controlado, se apreciará que estas “nuevas especies formadas” en la membrana enzimática se difunden en todas las direcciones, hacia la membrana sensible del ISFET(aislante de la puerta del ISFET) y hacia fuera de ella, esto

es hacia la solución. Las moléculas que difunden hacia el ISFET (especialmente los iones H^+) son precisamente las que originan una variación en la concentración superficial de la membrana sensible.

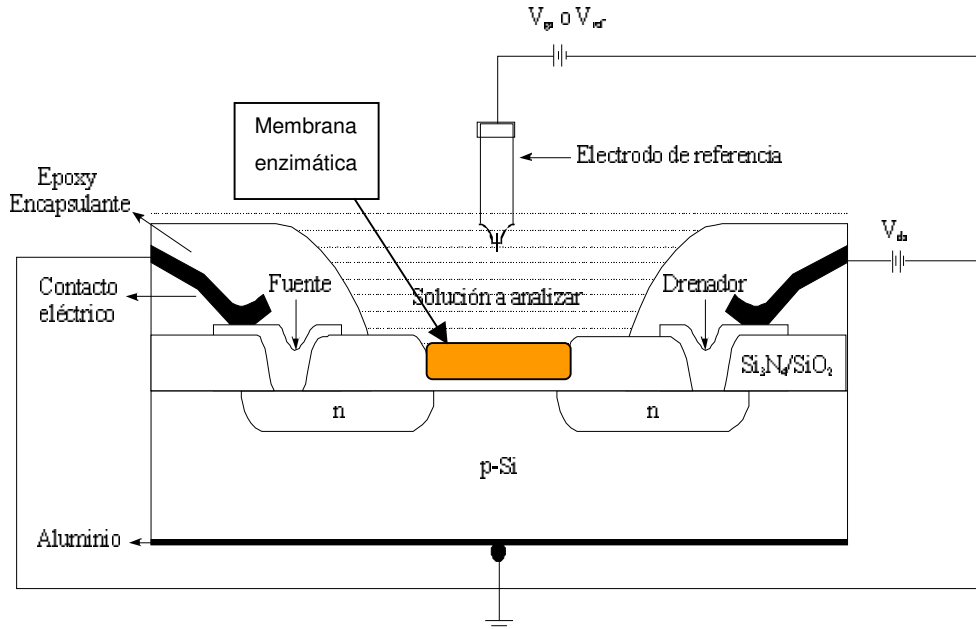


Figura II.5: Diagrama de un EnFET

Una condición de estado-estable se desarrolla, la cual se caracteriza porque la concentración de las especies en la interfase de la membrana que contiene a la enzima y la membrana sensible a los iones perteneciente al ISFET, permanece constante.

En el caso, donde un reactante en la solución y membrana enzimática es consumido debido a la reacción del sustrato, se observará que la concentración del reactivo controlado disminuye en la interfase membrana enzimática-membrana sensible a iones generándose al igual que en el caso anterior un estado-estable donde la concentración es constante.

En la figura II.6, se muestra un esquema de un EnFET interactuando con una solución en donde se encuentra el sustrato cuya concentración desea medirse. Existen dos interfases importantes. La primera interfase, en $x=0$, se tiene la superficie del ISFET en donde el flujo de cargas o corriente es cero, y la segunda interfase, en $x=L$ se tiene la interfase solución-membrana a través de la cual, todas las especies(excepto la enzima) pueden circular libremente.

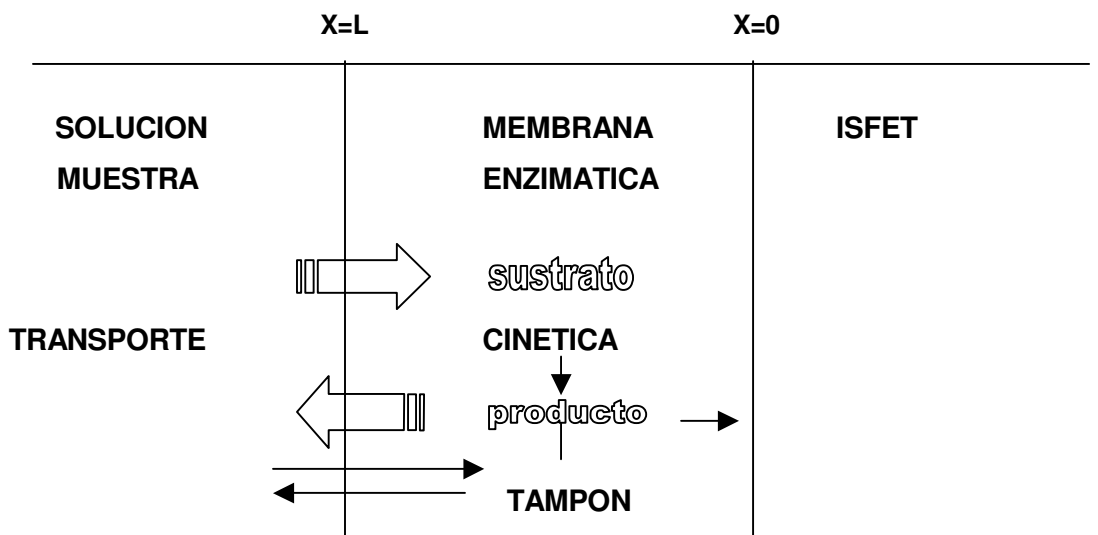


Figura II.6: Representación de la cinética de la reacción química en el EnFET

Por lo expuesto podemos notar que la respuesta global que emitirá el ENFET, depende de dos aspectos: Uno de ellos es el Termodinámico, que resulta de la interacción del ión-sensor y el otro se debe a la Cinética de la reacción química, representada por la reacción enzimática general II.5 y representada gráficamente en la figura II.6 :



Al interaccionar la membrana enzimática con la solución que contiene el sustrato o especie a ser detectada se produce un doble fenómeno que origina el comportamiento del dispositivo: Por un lado, una reacción química y por otro, el transporte de masa de las especies presentes y que se originan en la reacción química hasta la superficie del transductor.

De acuerdo al método de inmovilización utilizado para la membrana enzimática se plantean dos tipos de sensores: Uno de ellos es aquel en donde una monocapa de enzima ha sido covalentemente enlazada al transductor; el otro sensor consiste de un sistema en donde la enzima se encuentra en una capa gel o matriz, la cual se ha colocado sobre el transductor. El primer tipo de sensor implica una catálisis heterogénea en una superficie bien definida mientras que el segundo implica catálisis y transporte de masa a través de la membrana.

REFERENCIAS

1. Technology For Industry Ltd.; Microstructures and microsystems: technology, applications and markets 1997-2002, Biosensors, Wiburton (1999).
2. Velasco-García M., Mottram T.; Biosensor technology addressing agricultural problems. Review paper. Biosystems Engineering, vol 84, nº 1, 1-12 (2003)
3. G. A. Reichnitz, C. En. News, 5 (1998) 31.
4. H. Sakai, N. Kaneki, H. Kara; Anal. Chim. Acta, 230 (1990) 189.
5. C. Puig i Lleixà; Tesis Doctoral, UAB, (1999).
6. R.S. Sethi; Transducer aspects of biosensors; Biosensors&Bioelectronic 9, 243 (1994).
7. J. Lyndal York; Enzimas: Clasificación, Cinética y Control en Bioquímica, Tomo 1, T.M. Devlin; Ed. Reverté S.A.; (1986).
8. S. Alegret, M. del Valle, A. Merkoci; Sensores electroquímicos; Col·lecció Materials. Universitat Autònoma de Barcelona, (2004).
9. J.C. Díaz Zagoya, J.J. Hicks Gómez; Bioquímica; Interamericana, Mc Graw-Hill.
10. J. Gareth Morris; Físicoquímica para biólogos; Ed. Reverté
11. I. Posner; Enzimas y cinética enzimática en Bioquímica, E. Herrera; Ed. Interamericana, (1986).
12. J. G. Ruiz; Desarrollo de biosensores enzimáticos miniaturizados para su aplicación en la industria alimentaria, Tesis Doctoral, UAB. (2006).
13. M. Lambrechts, W. Sansen; Biosensors: Microelectrochemical Devices; Sensors Series; Inst. of Physics Pub.; (1992).
14. T. Kuriyama, J. Kimura, Y. Kawana; Development of biosensors with immobilized enzyme; Chem. Economy Eng. Rev. 17 (1985) 22.
15. Y. Miyahara, T. Moriizumi, K. Ichimura; Integrated enzyme FETs for simultaneous detections of urea and glucose; Sensors and Actuators 7 (1985) 1.
16. T. Kuriyama, S. Nakamoto, Y. Kawana, J. Kimura; New fabrication methods of enzyme immobilized membrane for ENFET; Proc. 2nd Int. Meet. Chemical Sensors, Bordeaux, France, (1986), pp. 568.
17. S. Nakamoto, N. Ito, T. Kuriyama, J. Kimura; A lift.off method for patterning enzyme-immobilized membranes in multi-biosensors; Sensors and Actuators 13 (1987) 165.
18. J. Kimura, Y. Kawana, T. Kuriyama; An immobilized enzyme membrane fabrication method using an ink jet nozzle; Biosensors 4 (1988) 41.
19. Y. Miyahara, F. Matsu, T. Moriizumi, H. Matsuoka, I. Karube, S. Suzuki; Micro-enzyme sensors using semiconductor and enzyme-immobilization techniques;

- Proc. Int. Meet. Chemical Sensors, Fukuoka, Japan, Sept. 19-22, 1983; Anal. Chem. Symp. Series, vol. 17, (1983) 501.
20. I. Karube, E. Tamiya, J.M. Dicks, M. Gotoh; A micro-sensor for urea based on an ion-selective field effect transistor, Anal. Chim. Acta 185 (1986) 195.
 21. Y. Hanazato, M. Nakako, S. Shiono; Multi-enzyme electrode using hydrogen-ion-sensitive field-effect transistor, IEEE Trans. Electron Devices ED-33 (1) (1986) 47.
 22. B.H. van der Schoot, P. Bergveld; The pH-static enzyme sensor, Anal. Chim. Acta 199 (1987) 157.
 23. S.A. Barker; Immobilization of the biological component of biosensors en Biosensors, Fundamentals and Applications; Ed. A.P.F. Turner, I. Karube, G. Wilson; Oxford University Press, (1987).
 24. I.J. Higgins, H.A.O. Hill, E.V. Plotkin; Measurement of enzyme catalysed reactions. European Patent 125.
 25. J. Woodward, Immobilised cells and enzymes: a practical approach, (Oxford: IRL). (1985).
 26. G. Guilbault, J-M Kauffmann y G. Patriarche, Immobilised enzyme electrodes as biosensors, Protein immobilisation: fundamentals and applications ed R. F. Taylor (New York: Dekker) pp 209.
 27. K. Mosbach; (ed.) Immobilized Enzymes, en Methods in Enzymology Vol.44, Colowick, S.P., Kaplan, N.O.; San Diego, Academic Press, (1976).
 28. S. S. Wongy, L. J. C. Wong; Chemical and Cross-Linking and the stabilization of Proteins and Enzymes. Enzyme and Microbial Technology, 14(11), p:866-874. (1992).
 29. B. Eggins; Chemical sensors and biosensors;Ed. John Wiley&Sons, England. (2002)
 30. D. Ivekovic, S. Milardovic y B. S. Grabaric; Palladium hexacyanoferrate hidrogel as a novel and simple enzyme immobilization matrix for amperometric biosensors. Biosensors&Bioelectronics 20(4), p:872-878. (2004).
 31. J.L. Romette, J.S. Yang, H. Kusakabe, D. Thomas; Enzyme Electrode for specific determination of L-lysine. Biotechnol. Bioeng. 25, (1983), 2557.
 32. L.B. Wingard, J.F. Castner, S.J. Yao, S.K. Wolfson, A.L. Drash, C.C. Liu; Immobilised glucose oxidase in the potentiometric detection of glucose. Appl. Biochem. Biotechnol. 9, 95.
 33. D. Tokinaga, T. Kobayashi, A. Katori, Y. Karasawa; Urease immobilised urea electrode and process for preparing the same U.S. patent 4, 476,005. Oct. 9th Hitachi Ltd; (1984).

34. L.J. Blum, P.R. Coulet; Coimmobilisation of luciferase and FMN oxireductase in an enzyme electrode. *Anal. Chim. Acta* 161,(1984), 355.
35. M. Kawaguri, S. Nankai, T. Iijima; Biosensor. *PCT Int. App.* WO8403562. 13 (1984).
36. D.S. Clark, L.K.Noyes, T.A. Grooms, P.E. Moore; Direct rapid electro-enzimatic sensor for measuring alcohol in whole blood and fermetation products-enzyme electrode using *Hansenula polymorpha* immobilised alcohol oxidase; *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 434, (1984^a),515.
37. M. Arroyo; Immobilized enzymes: Thoery, methods of study and applications. *Ars pharmaceutica.* 39(2), p: 93-157 (1998)
38. T. Kobayashi, K. Laidler; *Biotechnol. Bioeng.* 16 (1974), 77.
39. J. Janata, S. D. Moss; Chemically sensitive field effect transistors, *Biomed. Eng.* 241. (1976).
40. S. Caras, J. Janata; Field effect transistor sensitive to penicillin, *Anal. Chem.* 52 1935. (1980).

CAPITULO III: ASPECTOS CLINICOS

III. ASPECTOS CLINICOS SOBRE MEDICION DE LA CONCENTRACIÓN DE UREA

El presente trabajo implica un aporte a la medición indirecta de la concentración de urea en el líquido dializado, el cual, es descartado en las sesiones de hemodiálisis a las que se somete a los pacientes renales, se mostrará en este capítulo la situación marco del problema desde el punto de vista de la salud.

III.1 EL SISTEMA RENAL

El Sistema Renal comprende: dos riñones, dos uréteres, una vejiga urinaria y una uretra. Las principales funciones del riñón son[1]:

1. Limpian el cuerpo de impurezas y eliminan los componentes químicos que están de más en la sangre y que el organismo no necesita, ésto lo hacen a través de la orina.
2. Eliminan el líquido extra que hay en el cuerpo.
3. Ayudan a mantener la presión de la sangre dentro de los límites normales.
4. Protegen los dientes y los huesos, evitando que pierdan minerales como calcio, que los mantiene fuertes y duros.
5. Ayudan a regular la producción de los glóbulos rojos.

Estas funciones pueden clasificarse en función depuradora, la función reguladora y las funciones endocrino-metabólicas.

III.2 INSUFICIENCIA RENAL CRONICA

Se habla de Insuficiencia renal crónica (IRC) cuando los riñones son incapaces de cumplir las funciones anteriores. La mayoría de las veces se presenta lentamente, no tiene cura y llega hasta una etapa terminal en la que el usuario necesita un tratamiento que realice algunas de esas funciones, utilizándose para ello un riñón artificial junto con la dieta y el tratamiento médico; existe además el trasplante renal. Las causas más frecuentes de la insuficiencia renal crónica son :

1. Problemas congénitos del riñón y vías urinarias.
2. Procesos inflamatorios del riñón llamados glomerulonefritis
3. Daños renales debido a otras enfermedades como la diabetes, el lupus, la hipertensión.
4. Trastornos hereditarios.
5. Enfermedad renal debido a tóxicos.
6. Problemas obstructivos por tumores o cálculos.
7. Causa desconocida.

La pérdida de las funciones depuradora y reguladora origina retención de productos metabólicos tóxicos y alteración en el volumen, en la concentración de solutos y en el equilibrio ácido-base de los distintos compartimentos corporales, poniendo en peligro la vida del paciente hasta acabar con ella, a menos que se establezca una sustitución de estas funciones.

La pérdida de las funciones endocrino-metabólicas originan alteraciones notables en el organismo, sin embargo, no compromete la vida del paciente, aunque alteran la calidad de vida del mismo[2].

Para sustituir estas funciones se dispone de distintos procedimientos de depuración extrarrenal como son la Hemodiálisis y la Diálisis Peritoneal, según sea la membrana utilizada, y otros procedimientos de desarrollo más reciente como la ultrafiltración y la hemoperfusión. Estos procedimientos permiten remover las sustancias tóxicas en pacientes con fallas crónicas renales. Durante la diálisis los productos desecho del metabolismo como por ejemplo la urea, así como también exceso de agua, sodio, potasio y otros solutos son removidos de la sangre.

El tratamiento es necesario para la enfermedad renal crónica en estadio 5 o insuficiencia renal. El estadio de la enfermedad renal crónica se define midiendo la tasa de filtración glomerular (GFR) la cual se estima a partir de resultados de un análisis de sangre para creatinina, un producto de desecho de la actividad muscular. Si el GFR esta por debajo de 15, se dice que existe insuficiencia renal (enfermedad renal crónica en estadio 5) y se necesitará alguna forma de tratamiento para reemplazar la función de los riñones los cuales están trabajando bajo esta condición, entre el 5 al 15% de lo normal.[3,4]

Otro aspecto importante es el conocimiento de la concentración de urea para la detección de anomalías renales en los seres humanos. Esto sucede porque todas las proteínas introducidas en el organismo por la dieta diaria son descompuestas en el tracto digestivo en aminoácidos. El proceso más importante y que es responsable del control de los aminoácidos es el ciclo de la urea en el hígado. Por tanto, la urea es un producto final de este ciclo.

Desde el hígado la urea es transportada al riñón donde es filtrada y excretada en orina (hasta el 90% de todos los metabolitos nitrogenados). Los desordenes en el ciclo de la urea o en el camino de excreción de la urea originan un daño al cuerpo causado por la Hyperamonemia.

Por tanto, la concentración de urea y de la creatinina en la sangre son marcadores indirectos de la filtración glomerular debido a que los glomérulos (apetotonamiento vascular) no están cumpliendo su función adecuadamente. El rápido incremento en la concentración de la urea a un nivel constante de la creatinina es el primer indicador de la disfunción glomerular.

Pero antes de continuar, veamos ¿Qué es la diálisis y en qué consiste? Se denomina diálisis al paso de soluto y agua entre dos soluciones separadas por una membrana semipermeable.

La diálisis depende de dos fenómenos físicos básicos: la difusión y la convección. La **difusión** consiste en el movimiento de moléculas de soluto entre dos soluciones separadas por una membrana semipermeable siendo los factores influyentes:

1. El gradiente de concentración de las soluciones,
2. El peso molecular y
3. La resistencia de la membrana.

La transferencia de solutos entre dos soluciones se hace según el gradiente de concentración en el sentido de mayor a menor concentración tendiendo al equilibrio al cabo de un tiempo. Los solutos de menor peso molecular difunden más rápido que aquellos de peso molecular mayor. Por otro lado, el “tamaño” del soluto influye en el paso por los “poros” de la membrana los cuales ofrecen una resistencia conjuntamente con las láminas de los dos líquidos en contacto con ella al paso del soluto.

La **convección** consiste en el transporte de solutos a través de una membrana por el paso del solvente en el que están contenidos siendo los factores influyentes: la presión hidrostática y la presión osmótica. El solvente o fluido pasa de mayor a menor presión hidrostática y de menor a mayor presión osmótica; a este paso de fluido también se le conoce como **ultrafiltración**.

La difusión y convección actúan simultáneamente aunque la eficacia obtenida no es la suma de las dos.

III.3 HEMODIALISIS

La hemodiálisis es la purificación de la sangre a través de un riñón artificial, que funciona como un filtro formado por varios miles de fibras de celofán, las que tienen pequeños orificios microscópicos, que permiten que el exceso de agua e impurezas salgan de la sangre y pasen a la solución dializante, cuando la sangre del usuario pasa a través de ellos[1].

El tratamiento se realiza generalmente tres veces por semana y con una duración de tres a cuatro horas, siendo valorado por el médico previamente, el que según los siguientes criterios da la indicación del mismo:

- cuánto líquido se ha acumulado entre cada hemodiálisis,
- cómo se siente el usuario,
- qué indican las pruebas de sangre.

Para realizar la hemodiálisis es necesario contar con los siguientes componentes: Acceso vascular, Agujas o catéter para la hemodiálisis, Líneas de sangre arterial y venosa, Dializador, Sistema de heparinización, Líquido de diálisis, Planta de tratamiento de agua, Máquina de diálisis.

Una máquina de hemodiálisis consta de una bomba de sangre, un módulo de producción de líquidos de diálisis y las alarmas de seguridad. La bomba de sangre es del tipo peristáltico y permite un flujo de hasta 500 ml/min. El módulo de producción de líquido de diálisis tiene un sistema de bombas que hacen la mezcla del concentrado de diálisis con el agua tratada que procede de la planta de aguas. El agua que reparte la máquina de

diálisis tiene disuelta gran cantidad de aire que es tratada con un sistema de gasificación. Por otro lado hay un sistema para escalfar el líquido de diálisis a temperatura corporal. También hay una bomba de presión que actúa sobre el compartimiento de líquido de diálisis y crea una presión negativa para regular la ultrafiltración. Finalmente hay un sistema de esterilización químico y por calor de los circuitos internos del módulo de líquido de diálisis.

III.4 MODELOS CINETICOS DE UREA EN HEMODIALISIS

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, es aceptado que la urea es un indicador útil en la prescripción de la terapia de la diálisis y en su monitorización. Sin embargo, los pacientes con problemas renales deben cumplir con una serie de condicionamientos para poder llevar una calidad de vida adecuada, por ejemplo se creará una receta especial de diálisis. Esto ayudará a asegurar que obtenga la cantidad adecuada de tratamiento. Además, el equipo de diálisis controlará su tratamiento mediante análisis de laboratorio para determinar la cantidad de diálisis que recibe (la dosis de diálisis). La forma más precisa para valorar esto se denomina modelo cinético de la urea.

Los modelos cinéticos de urea son una forma de simular mediante el lenguaje matemático los movimientos de urea en el interior y hacia el exterior del organismo. Se conocen desde hace tiempo[6] como un método lógico de comprender el comportamiento de la urea en los pacientes dializados. Sin embargo, han tomado mayor interés desde la publicación del análisis mecanístico sobre los resultados del estudio cooperativo americano (NCDS) [7], en donde se describió el índice de Kt/V (donde K = aclaramiento del filtro, t = tiempo en diálisis y V = volumen de distribución de la urea), de urea como un parámetro para medir la «dosis de diálisis»[8].

La mayoría de los modelos cinéticos de urea describen el sistema a partir de su balance de masas basados en el principio de conservación de la materia. En su desarrollo se han utilizado conceptos procedentes de la farmacocinética, como volumen de distribución, tasa de producción y compartimientos. Se interpreta que la urea es como un fármaco de producción endógena a una tasa constante, denominada G , con diferentes vías de eliminación: aclaramiento renal (K_r) y aclaramiento del dializador (K_d) y con unas concentraciones variables, en el seno de un volumen de distribución (V) muy relacionado con el agua corporal total, (ver fig. 1). La urea es el

mayor producto resultante del catabolismo proteico, constituyendo cerca del 90 % del nitrógeno residual acumulado en el agua corporal total entre las sesiones de Hemodiálisis. La tasa neta de generación de urea (G) depende de forma lineal de la tasa neta de catabolismo proteico (PCR). Como G se mide mediante la cinética de urea, esta técnica nos proporciona una medida precisa de la PCR. En el paciente estable, la ingesta proteica es igual a la PCR, así que su medida da una información valiosa sobre la dieta. En el paciente inestable con una enfermedad aguda grave, el conocimiento de la PCR permite calcular el balance nitrogenado y así poder ajustar el contenido de aminoácidos de la nutrición para minimizar las pérdidas proteicas [9].

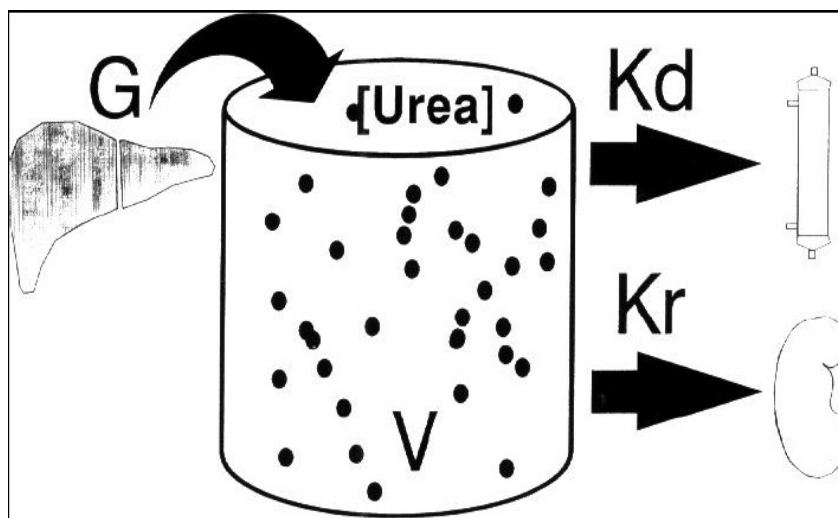


Figura 1. Esquema de los procesos que intervienen en el balance de Masas para la cinética de la urea[9]

Existen diversos modelos que surgen de las consideraciones iniciales; por ejemplo, si se asume un volumen de distribución fijo se tiene los modelos monocompartimentales pero si se asume dos o más se tiene los modelos bi o multicompartimentales; algunos consideran que estos volúmenes permanecen fijos durante el tiempo (volumen fijo) o que varían durante la hemodiálisis e interdiálisis (volumen variable).

III.4.1. MODELO SIMPLIFICADO

Utilizado para el cálculo de solamente el Kt/V , usando como datos iniciales los valores de concentraciones de urea pre y postdiálisis. De acuerdo a la ley de la difusión de Fick (La tasa de movimiento de las moléculas en disolución es proporcional a su concentración) se establece una cinética de orden 1:

$$dC/dt = K.C/V \quad \text{III.1}$$

Siendo:

- dC/dt cambio de concentración en el tiempo
- K Constante de eliminación que representa al aclaramiento
- C Concentración de urea
- V Volumen de distribución de urea

A partir de la expresión anterior se obtiene:

$$C_t = C_0 \cdot e^{-Kt/V} \quad \text{III.2}$$

Donde C_0 es la concentración inicial de urea y C_t es la concentración en un instante posterior. Considerando que estas concentraciones son las que se han medido en la prediálisis y postdiálisis respectivamente se tendrá la expresión:

$$Kt/V = \ln (C_{pre} / C_{post}) \quad \text{III.3}$$

Este modelo considera que durante la hemodiálisis se elimina sólo la urea producida interdiálisis y no se tiene en cuenta que además se está eliminando la generada durante la hemodiálisis, además la disminución del V que se da en la mayoría de las hemodiálisis conduce a un aumento de la C_{post} para una cantidad fija de urea total eliminada, al diluirse una misma cantidad de urea final en un volumen menor. Estos aspectos hacen que el Kt/V se encuentre subestimado[8].

III.4.2 MODELO MONOCOMPARTIMENTAL DE VOLUMEN FIJO

En este método se considera que el volumen de distribución de urea es un compartimento único e igual al agua corporal total y este volumen no cambia ni durante la diálisis ni en la interdiálisis. Esta basado en el balance de masas, considerando que la variación en el contenido de urea que existe en un tiempo dado es igual a la urea producida (G) menos la urea eliminada (K.C, aclaramiento por concentración):

$$V \cdot \frac{dC}{dt} = G - K.C \quad \text{III.4}$$

Este método al asumir que V no cambia está sobreestimándolo cuando exista pérdida de peso, todo esto implica que al tener estos valores de V se tendrán valores de G y de PCR infraestimados. Este modelo de volumen constante sólo es aplicable cuando el paciente tiene unas ganancias y pérdidas ponderables despreciables[8].

III.4.3 MODELO MONOCOMPARTIMENTAL DE VOLUMEN VARIABLE

En este modelo se considera la disminución del volumen por la hemodiálisis y el aumento en el período interdiálisis, al igual que en el caso anterior se basa en el balance de masas siendo la expresión general:

$$\frac{dV}{dt} \frac{dC}{dt} = G - K.C \quad \text{III.5}$$

Para calcular V es necesario medir la tasa de pérdida de volumen por ultrafiltración y para conocer G se debe medir la tasa de ganancia de peso interdiálisis, que es igual al aumento de peso dividido entre los minutos del intervalo interdialítico.

Este modelo ha sido usado para el control y el cálculo de los parámetros PCR, PCR normalizado y Kt/V en el NCDS[10,11] y su análisis mecanístico posterior. Todo esto ha llevado que sea el método de mayor uso en las publicaciones sobre diálisis adecuada.

III.4.4 MODELO BICOMPARTIMENTAL

Este modelo considera que la eliminación de urea, tanto por el aclaramiento renal residual como por el dializador, se hace sobre la urea extracelular, por tanto el balance de masas considera dos aspectos: El primero establece que la variación del contenido de urea extracelular es igual a la producción de urea menos la urea que pasa al espacio intracelular y la urea eliminada por el dializador y/o el riñón:

$$d(C_e.V_e)/dt = G - KC(C_e - C_i) - C_e(K_d + K_r) \quad \text{III.6}$$

Siendo: C_e concentración de urea extracelular

C_i concentración de urea intracelular

V_e volumen extracelular

V_i volumen intracelular

KC Coeficiente de transferencia de masas extra-intracelular

El segundo aspecto considera que la variación de la cantidad de urea en el espacio intracelular es igual a la que procede del espacio extracelular:

$$V_i \cdot \frac{dC_i}{dt} = KC \cdot (C_e - C_i) \quad \text{III.7}$$

Este tipo de modelos generan la necesidad de estimar parámetros como C, las variaciones de los volúmenes V_e , V_i y KC existiendo simplificaciones para evitar tener un modelo muy complicado respecto a los monocomportamentales[12-14].

III.4.5 CUANTIFICACION DIRECTA DEL DIALIZADO

Basado en la recolección completa del líquido dializado, con el fin de determinar la cantidad total de urea extraída durante la hemodiálisis[15,16]. En el balance de masas se plantea que la urea total extraída es igual a la urea generada más la disminución del contenido total de urea en el paciente. El volumen de distribución de urea se puede entender a grosso modo como el cociente de la cantidad de urea eliminada entre la diferencia en las cifras de urea pre-post. Se ha dicho que este método es el estándar de oro para la cinética de la urea[17] sin embargo existen algunas incoherencias con los valores de los parámetros encontrados en la práctica[18] y por otro lado es un método complicado para llevar a la práctica y pueden existir errores importantes por falta de homogenización del dialisante o por medición incorrecta del volumen total[8]

III.4.6 CONCLUSION ACERCA DE LOS MODELOS CINETICOS DE UREA

La finalidad de los modelos cinéticos de urea va dirigida a proveer, de una manera objetiva, un tratamiento dialítico adecuado para cada paciente y a valorar los cambios que este sufre en su estado nutricional inducidos por causas relacionadas o no con dicho tratamiento. Permite conocer la dosis de diálisis recibida por el paciente, siendo esto un aspecto fundamental en el control de calidad de la hemodiálisis.

El Kt/V con todos los cuestionamientos que se le imputa para significar dosis de diálisis, hasta el momento es un método aceptado en el mundo y puede llevar a conclusiones peligrosas si este indicador no es confiable ni reproducible ya sea en el análisis mensual de la dosis de diálisis entregada o para la realización de estudios longitudinales (sobrevida, nutrición etc.), que involucre al Kt/V como variable independiente [19-21].

En el Perú el 95% de la población en diálisis es tratado en función del Kt/V para calificar “calidad de diálisis” y para determinar este parámetro es necesario conocer la concentración de la urea siendo una condición imprescindible su medición exacta para la estimación posterior de la eficiencia en diálisis[22].

El grupo de trabajo de adecuación en hemodiálisis (DOQI) es enfático en señalar que una variable indisoluble de las mediciones del Kt/V es entre otras el procesamiento adecuado de las muestras de urea, de donde se deriva la recomendación de que las mediciones de urea deben ser reproducibles, de tal manera que los resultados sean comparables entre los diferentes centros u hospitales que usan el Kt/V como parámetro de eficiencia [23].

En pacientes en hemodiálisis crónica por lo general sin síntomas urémicos la inexacta medición de la urea para estimación del Kt/V, tiene trascendencia fundamental y puede llevar a descisiones erradas (cambios de filtro, aumentos del flujo de dializado, incrementos del tiempo de diálisis, etc) con impactos importantes en el componente económico y la aceptación del paciente al tratamiento dialítico[22].

III.4.7 METODOS DE MEDICION DE CONCENTRACION DE UREA

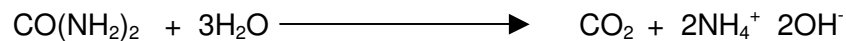
En función del método de operación, los métodos de medición de urea pueden ser divididos en 4 grupos:

- Optoelectrónico
- Masa sensible
- Electroquímico
- Térmico

En la práctica clínica son usados principalmente los métodos:

- Espectrofotometría enzimática
- Electroquímica enzimática
- Espectrofotometría no enzimática

En los métodos enzimáticos, la concentración de uno de los productos finales de la reacción de la hidrólisis de la urea catalizada por la enzima ureasa de acuerdo a la reacción:



es determinada mediante un adecuado sistema de medición.

En los métodos de espectroscopia enzimática se utiliza el amonio, el cual está en equilibrio con iones NH_4^+ , como un reagente en una reacción química de color. La reacción de BERTHELOT de amonio con hipoclorito y fenol y la reacción de NESSLER de amonio con tetraiodomercuriato son empleados para aquellos propósitos.

Otro método está basado en dos reacciones enzimáticas: la reacción de catálisis de la urea mediante la ureasa y la reacción de α -ketoglutarate con amonio en la presencia de glutamato deshidrogenasa y NADH. Este método es considerado como el método de referencia debido a su alta sensibilidad[24-27].

Los métodos espectrofotométricos no-enzimáticos son no específicos y consumen mucho tiempo. Todos los métodos espectrofotométricos son métodos de laboratorio y son excluidos de una monitorización ON-LINE de urea. Este inconveniente es superado en los métodos electroquímicos enzimáticos debido a la utilización de los biosensores.

III.4.8 MEDICION DE CONCENTRACION DE UREA EN LIQUIDO DIALISADO

Tal como se puede apreciar en los diferentes métodos de medición de concentración de urea mencionados anteriormente, los modelos clínicos que han sido usados utilizan los niveles de pre y post-diálisis de la urea nitrogenada en sangre (BUN: blood urea nitrogen) debido a que en los pacientes con diálisis la urea es considerada la molécula

de referencia para la remoción de solutos tóxicos de bajo peso molecular. Sin embargo, esta aproximación tiene algunos inconvenientes: es complejo, requiere mucho tiempo para el proceso total, se necesitan muestras de sangre y es potencialmente inseguro. La eficiencia de la diálisis es estimada mediante un modelo de la urea cinética en el suero, lo cual es una técnica indirecta. Debido a que el principal objetivo de la diálisis es remover los solutos de la sangre, las mediciones de urea en el líquido dializado se convierte en una forma más directa de medir con efectividad la hemodiálisis. Esto simplifica el modelamiento y permite predicciones más seguras de concentraciones en equilibrio en el organismo humano, incluso antes que el gradiente de todos los solutos se haya disipado. Además, desde el punto de vista analítico, el fluido de post-diálisis o dializado resulta ser una muestra mucho más simple que la sangre y el suero.

REFERENCIAS

1. El paciente en Hemodiálisis. Autocuidado
http://donacion.organos.ua.es/info_sanitaria/p-renal/autocuidado.htm; Ultima consulta: 16 enero 2008.
Hemodiálisis. Conceptos. Seguimiento del paciente. Cuidados. Artículo pdf en:
<http://www.carloshaya.net/biblioteca/contenidos/docs/nefrologia/dialisis/goyadelcampo>; Ultima consulta: 22 marzo 2008.
2. Medline Plus: Insuficiencia renal
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/kidneyfailure.html>; Ultima consulta: 23 marzo 2008.
3. Hemodiálisis/ Lo que necesita saber. National Science Foundation.
http://www.kidney.org/atoz/pdf/hemodialysis_sp.pdf; Ultima consulta: 23 marzo 2008.
4. Hemodiálisis. Información para pacientes con Hemodiálisis. FisteraSalud
<http://www.fistera.com/Salud/3proceDT/hemodialisis.asp>; Ultima consulta: 24 marzo 2008.
5. Cotch F: Hemodialysis: Technical and kinetic considerations. En; Brenner B Rector FC Jr, eds. *The Kidney*, 1st ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 1976, 1972.
6. Cotch F y Sargent J: A mechanistic analysis of the National Cooperative Dialysis Study (NCDS). *Kidney Int* 28:526, 1985.
7. Saracho R., Martínez I., Aguirre R., González O., Montenegro J.; Modelos cinéticos de urea en hemodiálisis. *Nefrología* Vol. XIV ; Suplemento 2. (1994).
8. Cotch F: Kinetic modeling in hemodialysis. En: Nissenson A, Fine R, Gentile D, eds. *Clinical dialysis*, 2nd ed. Connecticut. Prentice International Inc. 1986, pp. 119, (1990)
9. Lowrie EG, Laird NM, Parker TF y Sargent JA: Effect of the hemodialysis prescription on patient morbidity: Report from the National Cooperative Dialysis Study. *N Eng J Med* 305:1176-1181. (1981)
10. Sargent JA: Control of dialysis by a single-pool urea model: The National Cooperative Dialysis Study. *Kidney Int*, vol. 23, suppl. 13, pp. S-19-25, (1983).
11. Depner TA: Refining the model of urea kinetics: compartment effects. *Semin Dial*, vol 5: 141-154. (1992).
12. Depner TA: Multicompartmental models. Prescribing hemodialysis: a guide to urea modelling, Depner TA (ed) Dordrecht, Kluwer Academic Publisher, pp. 91-126. (1991).

13. Pedrini LA, Zereik S y Rasmy S; Causes, kinetics and clinical implications of postdialysis urea rebound. *Kidney Int* 34:817-824. (1988).
14. Malchesky PS, Ellis P, Nosse C, Magnusson M, Lankhosrst B y Nakamoto S; Direct quantification of dialysis. *Dial Trans.* Vol 11, 42-49. (1982)
15. Malchesky PS, Ellis P, Nosse C, Magnusson M. y Lankhosrst B ; A practical guide to kinetic modeling using the technique of direct dialysis quantification. *Dial Trans.* Vol 12, 694-704. (1983)
16. Aebischer P, Schorderet D, Juillerat A, Wauters JP y Fellay G; Comparison of urea kinetics and direct dialysis quantification in hemodialysis patients. *Trans Am. Soc. Artif. Organs* 31, 338-341(1985).
17. Gotch F; Kinetic modelling in hemodialysis. Nissenson A, Fine R, Gentile D, Editors *Clinical analysis*, 2nd ed. Connecticut. Prentice Hall International Inc. pp. 131(1990).
18. Fernandez JM, Carbonell ME, Mazzuchi N, Petruccelli D; Simultaneous analysis of morbidity and mortality factors in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int.* 41; pp. 1029-1034. (1992).
19. Hakim RM; Assessing the adequacy of dialysis. *Kidney Int.* 37; pp. 822-832. (1990).
20. Lowrie EG; Chronic dialysis treatment: Clinical outcome and related processes of care. *Am. J. Kidney Dis*24; pp. 255-266. (1994)
21. Pinares FE, Cieza JA, Castillo WN; Confiabilidad de las mediciones de urea e implicaciones en el cálculo del Kt/V en pacientes en hemodiálisis ; *Revista Med. Hered* 14 ; pp 5-11 (2003)
22. NKF-K / DOQI Clinical Practice Guidelines : Blood urea nitrogen sampling (BUN). *Am. J. Kidney Dis.* 30; S38-S41. (1997)
23. Gentskow, C.J., *J. Biol. Chem.* 143, 531 (1942).
24. Karr, W.B., *J. Lab. Clin. Med.* 9, 329 (1924).
25. Fawcett, J.K., and Scott, J.E., *J. Clin. Pathol.* 13, 156 (1960).
26. Talke, H., Schubert, G.E., *Enzymatishche Harnstoffbestimmung in BLUT and Serum in Optishcen Test NACH Warburg*, *Klin. Wchnschr* 43, 174 (1965).

**CAPITULO IV: SISTEMA DE MEDICION DE CONCENTRACION DE UREA
EN LIQUIDO DIALIZADO**

IV. PREPARACIÓN DEL ENFET PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE UREA

En el presente capítulo se muestra la implementación de un ENFET como parte fundamental del sistema de medición indirecta de la concentración de urea en líquido dializado. Este biosensor o ENFET será finalmente aplicable a la medición de concentraciones de urea en muestras reales proporcionadas por un hospital de la ciudad.

IV.1 PARTE EXPERIMENTAL

El ENFET a implementarse utilizará como material biológicamente sensible la enzima UREASA y como elemento Transductor un ISFET fabricado con tecnología NMOS. Este capítulo muestra las dos etapas del trabajo para la obtención del ENFET. La primera etapa consiste en obtener un ENFET en el laboratorio muy bien caracterizado y puesto a punto para realizar las mediciones mencionadas. La segunda etapa muestra el método seguido para realizar las mediciones sobre muestras reales en líquido dializado de la concentración de urea de pacientes sometidos a diálisis periódica en la Sala de Hemodiálisis del Hospital Parc Tauli (HPT).

Para las dos etapas de esta parte del trabajo se utilizan los mismos Medios experimentales que se indican el acápite IV.1.1

IV.1.1 MEDIOS EXPERIMENTALES UTILIZADOS

IV.1.1.1 APARATOS

Para la medición de la diferencia de potencial que se genera entre la superficie del aislante que soporta a la enzima del ENFET (en nuestro caso superficie del ISFET) y el electrodo de referencia se han utilizado los dos equipos siguientes:

a. **ISFET-metro** desarrollado en el Instituto Nacional de Microelectrónica de Barcelona mediante el cual se han realizado mediciones de modo continuo logrando la caracterización química de los ENFETs.

b. **Sistema Automatizado para la Caracterización de ISFETs e ISEs:** Este es un sistema realizado sobre la base del software LabView que ha sido desarrollado en el Laboratorio de Sensores del Instituto Nacional de Microelectrónica de Barcelona denominado "Sistema automatizado para la caracterización de ISFETs e ISEs" está formado por tres módulos que permiten medir temperatura, caracterizar ISFETs e ISEs.

El sistema ajusta los valores de potencial e intensidad de corriente del drenador a 0.5V y a 100 μ A respectivamente. El seguimiento de la respuesta en el tiempo es fácil por la ventana que presenta el sistema de este parámetro en el tiempo, lo cual nos ha permitido obtener los registros de tiempo de los ENFETs analizados. El montaje del sistema debe realizarse de acuerdo a lo mostrado en la figura IV.1.

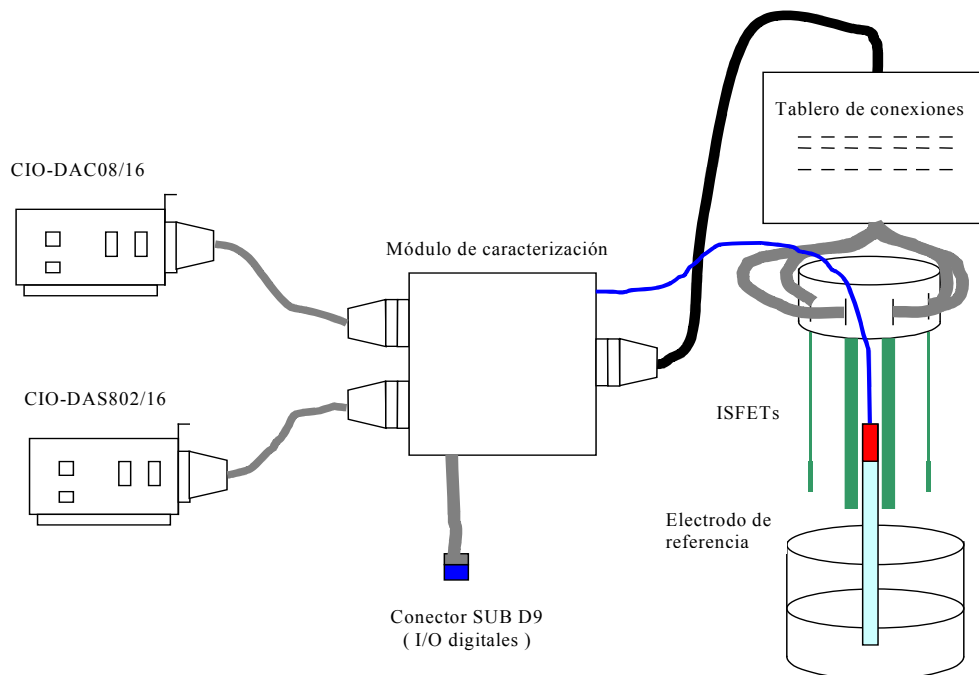


Figura IV.1: Sistema automatizado para la caracterización de los ENFETs

IV.1.1.2 ELECTRODOS

La polarización de la puerta del ENFET se ha realizado mediante un electrodo de referencia XR300 marca Tacussel. La solución de referencia es una solución salina de KCl.

El electrodo de pH es un electrodo combinado de pH de la marca Crison (modelo 52-00). Para calibrar este electrodo de vidrio se utilizaron soluciones tampón de pH 7.02 y 4.00 de la misma marca Crison.

IV.1.1.3 REACTIVOS Y SOLUCIONES

Todos los reactivos utilizados tanto en la preparación de la membrana enzimática como en la evaluación de los ENFETs y en las mediciones de la concentración de urea en muestras reales, fueron de calidad "pro análisis" o similares.

Para la preparación de la membrana se ha utilizado la enzima Ureasa from jack beans (EC 3.5.1.5) de la marca Fluka con una capacidad catalítica de 36.8 U/mg.

En la inmovilización de la enzima ureasa se utilizó albumina de suero bovino (BSA) de Sigma Chemical, glycerol proporcionado por la Ecole Centrale de Lyon y solución fosfatada (KH_2PO_4), marca Fluka. Para impedir el deterioro rápido de la membrana debido a iones de metales pesados y por tanto mejorar el tiempo de vida del ENFET se ha utilizado Acido Etilendiaminotetraácetico Sal Disódica 2-hidrato ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) conocido como EDTA de la marca Panreac. Además se dispuso de Cloruro de Sodio (NaCl) de la marca Fluka para agregar al tampón y evitar interferencias de estos elementos existentes en las muestras de urea en líquido dializado.

Las muestras reales en líquido dializado de pacientes con problemas renales fueron proporcionados por la Sección de Hemodiálisis del Hospital Parc Tauli de Sabadell, Barcelona. La composición del líquido de hemodiálisis utilizada en este centro es (todas las unidades son: mmol/L, excepto las que se indican): Na^+ : 140.0; K^+ : 1.5; Ca^{2+} : 1.25; Mg^{2+} : 0.5; Cl^- : 106.0; HCO_3^- : 35.0; CH_3COO^- : 4.0; Glucosa 1.0 g/L; Osm:294.0 mosm/L.

Para fijar la membrana enzimática sobre el ISFET o sensor interno se utilizó una solución de glutaraldehido 25% solución acuosa marca Fluka ubicada en un cristizador marca DUNCAN.

El agua utilizada durante todo el trabajo para formar las soluciones y lavar fue de tipo desionizada.

IV.1.2 PRIMERA ETAPA: PREPARACION DEL ENFET

El proceso de preparación del ENFET, consiste en dos partes:

- a. Preparación del transductor
- b. Preparación y deposición de la membrana enzimática sobre el transductor.

IV.1.2.1 PREPARACION DEL TRANSDUCTOR

El transductor utilizado en el presente trabajo es de dos tipos de ISFETs fabricados en el Instituto Nacional de Microelectrónica de Barcelona, con “juegos de máscaras”

NIVEL	NOMBRE	DESCRIPCIÓN
1	PWEL	Implantación de pozo
2	SDIS	Implantación de drenador y fuente
3	BIMP	Implantación de contacto con pozo
4	OXIP	Regiones de óxido
5	VTAD	Implantación de ajuste de la tensión umbral
6	NITR	Definición del nitruro de silicio
7	TAN1	Definición del óxido de tantalio (para lift-off)
8	WIND	Abertura de los contactos
9	META	Definición del aluminio
10	TAN2	Definición del óxido de tantalio (para lift-off) post-metalización
11	CAPS	Abertura de la pasivación
12A	PLAT	Definición del platino
12B	POL1	Definición de polisilicio
13	ENCA	Definición de pre-encapsulado
14	MET2	Definición del aluminio de contacto con anillo

Tabla IV.1: Juego de máscaras del CNM096

diferentes para cada uno de ellos, siendo el proceso tecnológico el mismo, estos son: CNM096 y CNM112, la diferencia entre ellos radica en el tipo de alineamiento utilizado.

El CNM096 incorpora los niveles necesarios para llevar a término la formación del pozo de aislamiento mientras que el juego de máscaras CNM112 permite fabricar ISFETs aislados a partir de obleas BESOI. La Tabla IV.1 muestra el juego de máscaras del CNM096.

La figura IV.2, muestra la superposición de los diferentes niveles de este juego de máscaras. El área total del “chip” es de 3x3 mm. El ISFET situado en la parte superior está formado por dos difusiones alargadas en forma de trapecio. Las dimensiones de la puerta son $500 \times 10 \mu\text{m}$ (ancho x largo). Debajo del ISFET se ha colocado el transistor MOS. Las dimensiones de las difusiones y de la puerta se han mantenido iguales a las del ISFET. En la parte inferior están las líneas de puntos de soldadura. También se encuentra cerca de la puerta del ISFET un electrodo de platino.

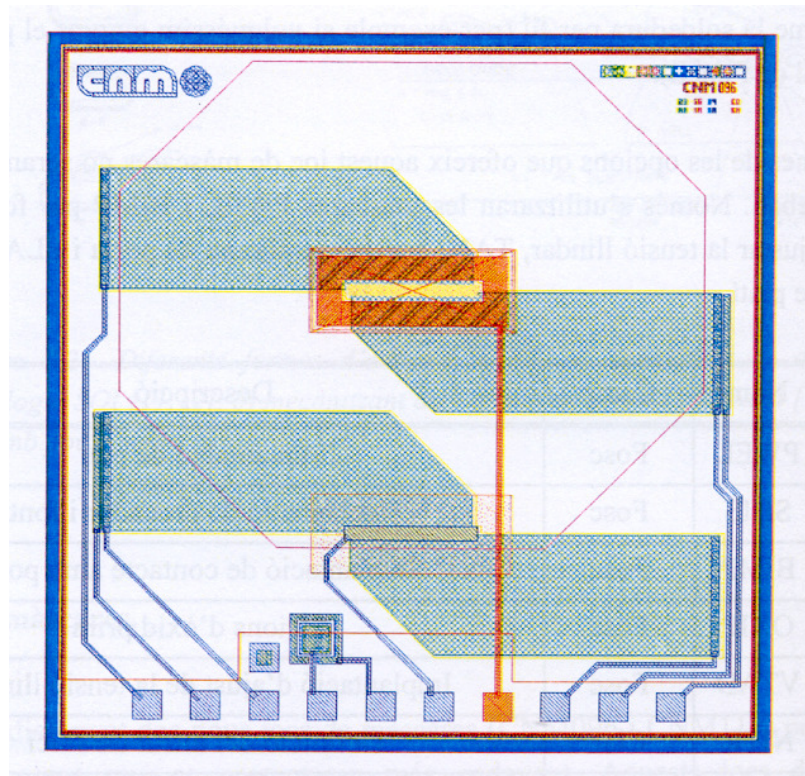


Figura IV.2 Juego de máscaras CNM096

La Tabla IV.2 muestra los diferentes niveles de máscaras del juego CNM112. Los cuatro primeros tienen la misma función que el juego de máscaras usado para el CNM096.

Con este juego de máscaras se definen cuatro circuitos diferentes (figura IV.3):

Primer circuito:(parte superior izquierda de la figura IV.3) Muestra dos ISFETs con geometrías idénticas. Las dimensiones de la puerta son: 500x10(anchoxlargo). Uno de los ISFETs tiene un anillo de protección alrededor de la puerta como el definido en el juego de máscaras CNM096; el otro ISFET tiene también un anillo de protección alrededor de la puerta pero dividido en dos partes, cada uno con conexiones independientes. Este tipo de sistemas esta pensado para estudiar nuevas aplicaciones del ISFET como un sensor mixto amperométrico-potenciométrico.

El segundo circuito:(parte superior derecha de la figura IV.3) Presenta un ISFET y un MOS con geometrías idénticas e iguales a las del primer chip. Este chip es similar al definido con las máscaras CNM096.

NIVEL	NOMBRE	DESCRIPCIÓN
1	SDIS	Implantación de drenador y fuente
2	OXIP	Regiones de óxido
3	VTAD	Implantación de ajuste de la tensión umbral
4	NITR	Definición del nitruro de silicio
5	TAN1	Definición del óxido de tantalio (para lift-off)
6	WIND	Abertura de los contactos
7	META	Definición de aluminio
8	CAPS	Abertura de pasivación
9	PLAT	Definición de platino
10	ENCA	Definición del pre-encapsulado
11	ZANJ	Abertura de las guardas
12	MET2	Definición del aluminio de contacto con el anillo

Tabla IV.2: Juego de máscaras del CNM112

El tercer circuito:(parte inferior izquierda de la figura IV.3) Muestra tres tipos de ISFETs diferentes. Dos de ellos, ubicados en la parte superior, están conectados mediante puntos de soldadura y se utilizan para el estudio del ISFET en condiciones de polarización especial.

El cuarto circuito:(parte inferior derecha de la figura IV.3) Muestra estructuras de test para realizar la caracterización completa de la tecnología como pueden ser: capacidad

del óxido para la determinación del grosor y la densidad de cargas del mismo así como del dopaje del sustrato; transistores de diferentes dimensiones y dieléctricos de puerta, estructuras para comprobar la resolución de cada etapa de fotolitografía y grabado, etc.

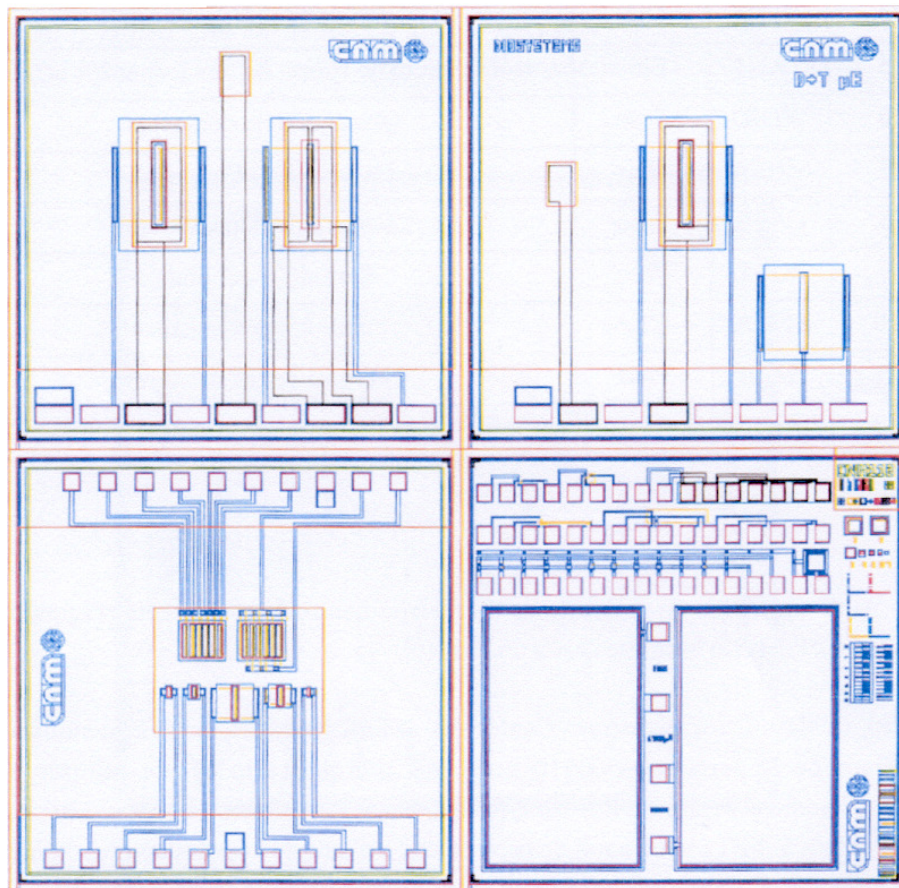


Figura IV.3 Juego de máscaras del CNM112

Los ISFETs utilizados son indistintamente de cualquiera de estos juegos de máscaras y se encuentran montados sobre tiras de circuito impreso de 10 cm de longitud por 0.5 cm de ancho y las conexiones entre los “pads” del sensor y las pistas de la tira se realizaron con hilo de aluminio empleado en la técnica del “wire-bonding” estándar en la encapsulación de circuitos integrados.

La preparación de los EnFETs se inicia trabajando con los ISFETs lo cual implica lavarlos y calibrarlos. Posteriormente se debe preparar la membrana enzimática y la deposición de la misma sobre el ISFET. Los ISFETs se lavan con agua desionizada y se observan al microscopio para comprobar que la superficie esta muy limpia, en caso

de no ser así, se limpia la superficie con ácido HF al 2% por un tiempo breve no mayor a 15 s, con lo cual se logra limpiar los residuos generados en la etapa de encapsulamiento del dispositivo.

Para la calibración de los ISFETs, se utiliza el Sistema automatizado para la caracterización de EnFETs mostrado en la Fig. IV.1 que también se usa para el trabajo con los ISFETs, la disposición de los elementos es la siguiente: En la solución tampón TRIS está introducido el ISFET, el electrodo de referencia y un electrodo de pH. El ISFET y el electrodo de referencia están conectados al ISFETmetro que registra los potenciales eléctricos en la superficie del aislante del ISFET, mientras que el electrodo de pH está conectado a un pHmetro que registrará la variación del pH de la solución al agregar los pequeños volúmenes de HCl.

La calibración del ISFET se realiza utilizando el método de adición usando HCl en concentraciones de 5M y 1M que se vierten pequeños volúmenes en la solución tampón que en nuestro caso es el: TRIS(Hidroximetil) Aminometano ($C_4H_{11}NO_3$) de 0.05M.

En esta etapa del trabajo se han utilizado en total 30 ISFETs, tanto de la tecnología CNM096 como de la CNM112, habiéndose caracterizado todos ellos con la misma metodología, encontrándose sensibilidades de 57 mV/dec como promedio.

IV.1.2.2 PREPARACION DE LA MEMBRANA ENZIMATICA

Nuestros trabajos iniciales de obtención de membranas enzimáticas consideraban una concentración de 10 mM habiéndose utilizado: Ureasa, BSA, solución tampón de 10 mM y glicerol; por otro lado las condiciones de trabajo más adecuadas para las mediciones de concentración de urea se consiguen cuando al usar esta membrana enzimática se utilizaba una solución tampón de trabajo fosfatada más KOH de 10 Mm, pH 7.4. La respuesta de este ENFET es lineal en el rango $2 \cdot 10^{-3}$ a $8 \cdot 10^{-3}$ M. Sin embargo el tiempo de vida y la reproducibilidad de la respuesta no eran satisfactorias.

Realizadas las conversaciones con el personal médico de la Sección de Hemodiálisis del HPT, se conoció que la concentración de la urea en el efluente o líquido dializado proveniente de la máquina de hemodiálisis se encontraba en este rango de $2 \cdot 10^{-3}$ a $8 \cdot 10^{-3}$ M, por lo que se pensó inicialmente en realizar las mediciones en forma directa

con el ENFET desarrollado. Sin embargo los resultados obtenidos y el comportamiento de la señal de salida del sensor mostró que el pH de la muestra real que contenía la concentración a determinarse era muy variable y prácticamente imposible de mantenerla constante durante el período de medición (alrededor de 3 min.) de la concentración de la urea en la muestra real debido a que se observaba un aumento constante de su valor impidiendo de esta manera las condiciones óptimas de trabajo para las que fue diseñado.

Lo anterior llevó a construir otro sensor con algunas consideraciones adicionales en la membrana enzimática, solución de tampón de trabajo, eliminación de posibles interferentes y solución de almacenamiento del ENFET.

La razón de esta consideración es que las muestras reales tendrían que ser diluidas por un factor mínimo de 10 para evitar la variación rápida del pH de la muestra, no tener dificultades por diferencias en la intensidad iónica, y porque la dilución estaría trasladando la región lineal de la respuesta a valores convenientes del futuro ENFET a diseñarse. Las condiciones de trabajo para este ENFET son: membrana enzimática 10mM y solución tampón de trabajo 10 mM ambos con un pH 7.4. A partir de esta información se empezó a preparar el ENFET para nuestra aplicación.

A partir de resultados iniciales no satisfactorios, se empezó a trabajar en mejorar el tiempo de vida útil de los ENFETs y la sensibilidad de los ENFETs, observándose que utilizando el componente EDTA en la membrana y en la solución de almacenamiento de los ENFETs se mejoraba los resultados obtenidos anteriormente. Por tanto, para la preparación de la membrana enzimática se ha seguido los siguientes pasos:

- a. Inmovilización de la enzima y preparación de la membrana: Se ha utilizado la enzima UREASA, que cataliza de manera específica a la urea, con el BSA produciéndose un crosslinking entre estos elementos en solución tampón fosfatada con EDTA conjuntamente con el glycerol. La función que cumple el EDTA es la de un estabilizador para complejas trazas de metales que podrían inhibir la actividad enzimática. Es conocido que la ureasa es una enzima no muy estable debido a que puede ser rápidamente inhibida por varios reagentes químicos como los iones mercurio y otros iones de metales pesados. La presencia de aquellos iones a nivel de trazas originan un decrecimiento en la respuesta del sensor. El glycerol es usado como un plastificador para evitar la formación de cristales en la membrana

enzimática durante el almacenamiento del EnFET y también para mantener la actividad de la enzima durante el proceso de inmovilización, homogenizar la membrana y mejorar la adhesión de la membrana a la superficie del ISFET.

- b. Deposición de la membrana sobre el sensor interno: La deposición de la membrana obtenida en el paso anterior se realiza manualmente colocando una alícuota de dicha membrana sobre la capa aislante de Si_3N_4 del ISFET.
- c. Posteriormente se introduce el ISFET con la membrana enzimática depositada, en el Cristalizador marca DUNCAN que contiene vapor saturado de glutaraldehído. El objetivo de este paso es "cubrir" la membrana enzimática ayudándola a fijarse a la superficie del transductor y constituir una capa porosa que permitirá el paso del sustrato proveniente de la solución de trabajo hacia la enzima para producirse la reacción catalítica enzima-sustrato.
- d. Evaporación del glutaraldehído: El siguiente paso consiste en extraer el EnFET del cristalizador y colocarlo a temperatura ambiente para que el glutaraldehído se evapore y la membrana sea "secada". En la exposición del EnFET a temperatura ambiente se debe tener las consideraciones adecuadas para evitar que no haya interferencia de polvo o cualquier otra partícula que finalmente pueda ubicarse sobre la membrana y alterar su correcto funcionamiento.
- e. Limpieza del EnFET: Con la finalidad de eliminar restos de elementos que no han logrado conformar la membrana o adherirse al sensor interno, se procede a lavar el dispositivo con solución tampón y EDTA agitada.
- f. Conservación y almacenamiento de los EnFETs preparados: Después que el EnFET ha sido preparado de acuerdo a los pasos previos, éste se guarda en solución tampón conteniendo EDTA a 4°C . Igualmente el ENFET debe ser almacenado a esta temperatura después de cada prueba a la que se somete.
- g. La membrana enzimática se guarda a -20°C para futuras aplicaciones.

Siguiendo la metodología descrita se han preparado una serie de membranas obteniéndose los mejores resultados con las siguientes cantidades:

90 µl de solución tampón fosfatada, KOH 10mM con EDTA 1mM; pH 7.4

10 µl de Glycerol

7 mg de BSA

6.5 mg de Ureasa

Tiempo de exposición de la membrana enzimática al glutaraldehído: 1hr20min

Tiempo de evaporación en el medio ambiente del glutaraldehído: 20 min

Tiempo de lavado del EnFET: 20 min

IV.1.2.3 EVALUACION DE LOS ENFETs

La evaluación de los ENFETs de urea se ha realizado estudiando algunas características indicadoras de la calidad de la respuesta y comparando los resultados obtenidos al medir la concentración de urea en líquido dializado real proporcionado por la Sección de Hemodiálisis del Hospital Parc Tauli de Sabadell, Barcelona.

Por tanto, se han estudiado las condiciones óptimas de trabajo, la reproducibilidad de la respuesta de los parámetros de calibración, el límite inferior de respuesta lineal (LIRL), las características dinámicas de respuesta, los valores de concentración de urea medidos en muestras reales y comparadas con las concentraciones de urea que medía sobre las mismas muestras el Laboratorio de análisis Dr. Echevarne de Saint Cugat, Barcelona. En general, se trata de parámetros muy concretos obtenidos directamente de las calibraciones realizadas que permiten suministrar esta información y de la validación del método de manera comparativa al ser medido por un Laboratorio particular.

IV.1.2.4 SISTEMA DE EVALUACION

Para realizar las calibraciones que nos suministrarán información necesaria para estudiar las condiciones óptimas de trabajo se ha utilizado el método de adición consistente en medir las diferencias de potencial del ENFET que se generan al agregar volúmenes pequeños de diferentes concentraciones de urea. Esto es posible debido a que al agregar pequeñas cantidades de urea de concentración conocida a un volumen inicial de solución tampón fosfatada conteniendo NaCl (25ml) y pH 7.4 es posible calcular la concentración de la disolución y de igual manera para las sucesivas adiciones de urea. El rango de concentración habitual de la urea en la solución de trabajo ha sido: 10^{-6} a 10^{-2} M.

Para el estudio de los ENFETs es necesario el uso de soluciones tampón debido a que la reacción de descomposición de la urea en dióxido de carbono y amoníaco que se produce en el interior de la membrana enzimática, puede variar el pH debido a las propiedades ácido-base de estos productos. Por lo tanto, la solución inicial tamponada pretende regular el pH para evitar afectar la respuesta del transductor y desnaturalizar la enzima.

En esta etapa se ha considerado la adición de NaCl por ser este un elemento presente de manera notoria en la sangre y en el líquido de dializado (cloruro sódico: 206.605 g; Na⁺: 140.0 mmol/L; Cl⁻: 106.0 mmol/L) lo cual al interactuar con la membrana enzimática genera interferencias que influyen en la respuesta del sensor observándose señales atenuadas respecto a las señales que se obtienen cuando no está presente esta solución de NaCl. El pH utilizado obedece a los resultados obtenidos en el Trabajo experimental y por la aplicación en curso.

Antes de proceder a realizar las mediciones de la concentración de urea en las muestras reales del hospital Parc Tauli es necesario realizar la calibración del sensor ENFET para lo cual se toma como referencia dos valores de concentración de urea pura, estos valores de concentración deben formar parte de la región lineal de respuesta del dispositivo. Para cada valor de concentración de urea se genera un potencial eléctrico que se registra y luego se procede a medir las concentraciones de las muestras reales de urea previamente diluidas por un factor de 10 o más en la solución tampón de trabajo, con la intención de eliminar la variación del pH que imposibilita la medición adecuada.

IV.1.2.5 PARAMETROS DE CALIBRACION

Debido a que las curvas de calibración obtenidas que representan la lectura del potencial respecto del logaritmo de la concentración son lineales en determinados rangos de concentración se realiza una regresión lineal por mínimos cuadrados proporcionados por el software GRAPHER utilizado en el presente trabajo, permitiendo observar algunos parámetros de interés como la estabilidad de la respuesta, pendiente, la ordenada de origen y el coeficiente de correlación. Otros parámetros importantes son:

a. Límite Inferior de Respuesta Lineal (LIRL)

En forma práctica, para el presente trabajo se ha determinado este parámetro observando las curvas de calibración fijándose el LIRL en aquel punto donde la curva pasa a ser lineal y a partir de la cual las variaciones del potencial eléctrico son más apreciables. Por lo tanto este valor es relativo y está en función de las condiciones de trabajo.

b. Límite práctico de detección lineal (LPDL)

Indica el punto cartesiano a partir del cual se inicia la linealidad de la respuesta del dispositivo.

IV.1.2.6 REPRODUCIBILIDAD DE LA LECTURA DEL POTENCIAL ELECTRICO

Un parámetro importante que permite ver si la lectura del potencial es reproducible es el valor de la ordenada de origen de las curvas de calibración. En este caso se han trabajado en períodos cortos en donde la actividad de la enzima esta vigente observando los valores que dicha ordenada presentaba.

IV.1.2.7 CARACTERISTICAS DINAMICAS DE LA RESPUESTA

Consiste en determinar el tiempo de respuesta del ENFET al adicionar las cantidades pequeñas de urea a la solución tampón. Este tiempo de respuesta se considera desde el instante en que se produce la aparición de la variación del potencial eléctrico hasta que se alcanza el 95% de la señal estabilizada.

Para los biosensores en general, éste parámetro resulta muy importante porque los tiempos de respuesta pueden ser muy variados y por lo tanto puede darse el caso en que se tenga un dispositivo que permite obtener “buenas” respuestas eléctricas pero deben ser rechazados por ser muy lentos en la estabilización del potencial eléctrico.

IV.1.2.8 CARACTERIZACION ELECTRICA DEL ENFET

Esta caracterización consiste en la obtención y el análisis de las diferentes curvas típicas del transistor de efecto de campo ($I_{DS}-G_m-V_{GS}$; $I_{DS}-V_{DS}$). De esta manera se

define completamente el funcionamiento de los ENFETs como dispositivos electrónicos.

Este tipo de caracterización es otro tipo de estudio de la sensibilidad química de los ENFETs de urea pero en modo discontinuo y consiste en determinar las variaciones de la tensión umbral del dispositivo en función de la concentración de la urea presente en la solución de medida.

IV.1.2.9 RESULTADOS Y DISCUSION

En esta parte se hará una descripción de las características de respuesta del ENFET siguiendo las directivas expuestas en los apartados anteriores a partir del IV.1.2.3. Para tal efecto se han considerado los parámetros de calibración y reproducibilidad, intervalo de linealidad de la respuesta, y en el caso óptimo tiempo de vida. Igualmente se expone el método utilizado para la medición de la concentración de urea en muestras reales.

Se tiene claro que debemos tener un ENFET que permita trabajar con muestras reales en líquido dializado a las cuales se debía diluir por un factor mínimo de 10 para que sea detectado por el ENFET cuya linealidad en su respuesta así lo exigía.

IV.1.2.9.1 ESTUDIO DEL METODO DE EVALUACION

En el apartado IV.1.2.4 se muestra el método utilizado para hacer las evaluaciones de la respuesta, esto significa la calibración en función de los iones H^+ que se presentan luego de producida la reacción en la membrana enzimática y que interactúan con el ISFET.

En esta etapa se pretende obtener mejores resultados respecto al tiempo de vida del dispositivo y también proyectarnos a la aplicación en donde encontraremos interferentes que pueden dañar al EnFET y modificar la respuesta. Por estas razones, la membrana enzimática utilizada contiene en este caso un elemento que permite eliminar las posibles interferencias de trazas de iones metálicos y que actúa como un preservante de la sensibilidad del sensor, este elemento agregado es el EDTA.

Igualmente, en función de los componentes que presenta el líquido dializado que contiene la urea, se ha adicionado 150 mM de NaCl a la solución tampón. Las calibraciones se han realizado con el mismo electrodo de referencia para asegurar que los diferentes resultados dependen fundamentalmente de las características de la solución tampón.

IV.1.2.9.2 PARAMETROS DE CALIBRACION

Las curvas de calibración obtenidos permiten observar el rango lineal del ENFET en un sistema cartesiano potencial eléctrico vs. Logaritmo de la actividad de urea. El sistema utilizado para la calibración estuvo formado por: El ENFET y el electrodo de referencia introducidos en una solución tampón fosfatada y KOH conteniendo NaCl agitada a velocidad constante siendo el volumen 25 ml. El ENFET esta conectado al ISFETmetro quién muestra, mediante el software LabVIEW, las curvas dinámicas y valores de potencial eléctrico que se van generando en la puerta del ISFET al adicionar las pequeñas cantidades de urea pura.

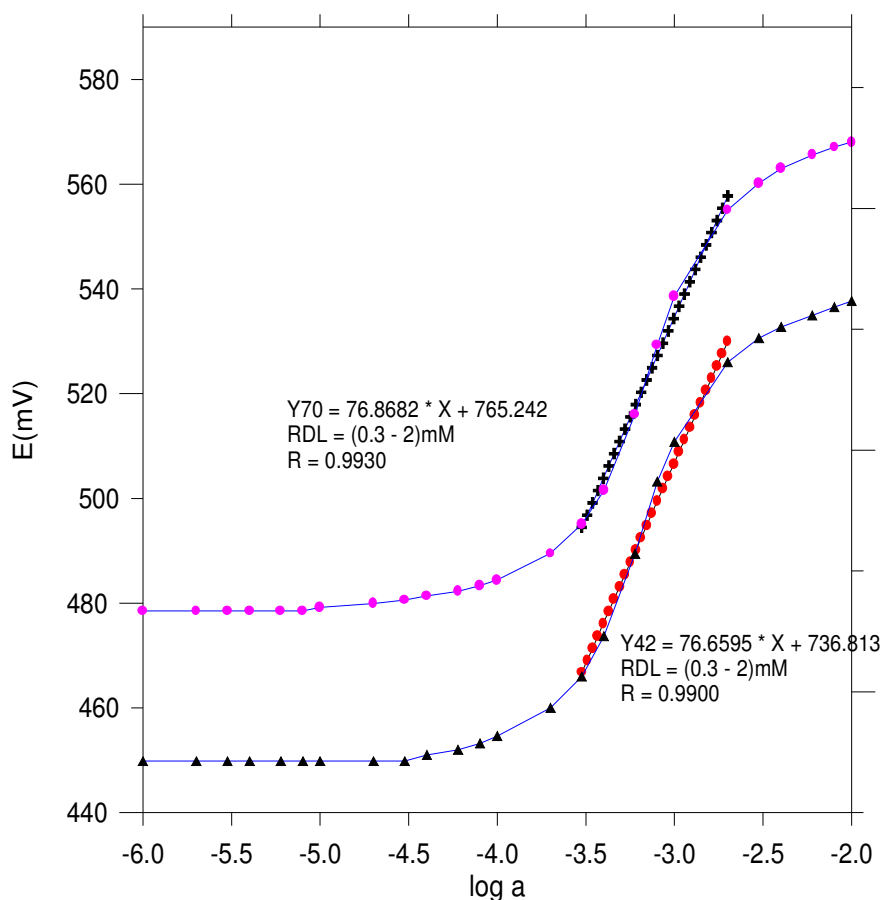


Figura IV.4 Curvas de calibración del ENFET814 los días 42 y 70 de pruebas

La figura IV.4 muestra dos curvas de calibración del ENFET814 realizadas durante los días 42 y 70 después de la primera medición con este dispositivo; se aprecia que las sensibilidades son similares y que existe un desplazamiento en el eje vertical debido a factores que se explican en el punto IV.1.2.9.2 parte b. Las sensibilidades del dispositivo en estos días se muestran mediante las ecuaciones lineales Y_{42} , Y_{70} que aparecen en la parte interior del recuadro de la figura IV.3 al igual que el Rango lineal de detección, RDL y el coeficiente de determinación o regresión simple, R.

T_{VIDA} (día)	S (mV/dec)	E^0 (mV)	R	RDL (M)	S-S _{MEDIA} (mV/dec)
1er. día	85.15	689.56	0.9887	$3 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-3}$	8.13
2do. día	80.54	694.44	0.9894	$3 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-3}$	3.51
3er. día	78.8	698.62	0.9906	$3 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-3}$	1.78
4to. día	78	701.96	0.9924	$3 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-3}$	0.98
5to. día	77.25	704.36	0.9893	$3 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-3}$	0.23
6to. día	76.45	707.28	0.9916	$3 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-3}$	-0.57
20mo. día	78.15	712.12	0.9898	$3 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-3}$	1.13
30mo. día	77.15	718.46	0.9903	$3 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-3}$	0.13
40mo. día	75.67	728.06	0.9947	$3 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-3}$	-1.35
42do. día	76.65	736.81	0.9900	$3 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-3}$	-0.37
45to. día	77.91	746.44	0.9852	$3 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-3}$	0.89
48vo. día	78.23	751.68	0.9887	$3 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-3}$	1.21
49no. día	78.24	751.73	0.9880	$3 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-3}$	1.22
50mo. día	77.18	754.62	0.9915	$3 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-3}$	0.16
52do. día	77.28	758.42	0.9921	$3 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-3}$	0.26
53er. día	77.38	760.78	0.9932	$3 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-3}$	0.36
60mo. día	75.25	762.75	0.9948	$3 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-3}$	-1.77
61er. día	74.88	763.12	0.9916	$3 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-3}$	-2.14
70mo. día	76.87	765.24	0.9930	$3 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-3}$	-0.15
75to. día	76.85	765.74	0.9932	$3 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-3}$	-0.17

TABLA IV.4 Principales parámetros del ENFET814

La Tabla IV.4 muestra los resultados obtenidos al trabajar con un ENFET cuya membrana enzimática ha sido obtenida siguiendo los pasos mencionados en el punto IV.1.2.2 con los valores de los elementos que se mencionan, siendo la solución tampón de trabajo una solución fosfatada, KOH de 10 mM, pH 7.4 conteniendo 150mM de NaCl por las razones expuestas en IV.1.2.4.

En esta Tabla IV.4 se tiene que: T_{VIDA} indica el día en que se ha realizado la medición, S pendiente de la región lineal de la curva obtenida o sensibilidad del dispositivo, E^0 indica la ordenada en el origen, R es el coeficiente de determinación o regresión simple, RDL es el Rango lineal de detección y $S-S_{MEDI}$ es la desviación de la sensibilidad del dispositivo respecto al valor medio.

a. Sensibilidad o Pendiente

La sensibilidad S que muestra el sensor en la Tabla IV.4, presenta dos características. La primera de ellas es que los primeros 3 días presenta sensibilidades decrecientes hasta obtener un valor que mantendrá prácticamente constante durante el resto del tiempo con variaciones del orden de $\pm 2.7\%$ (sin considerar los primeros 3 valores de la Tabla IV.4).

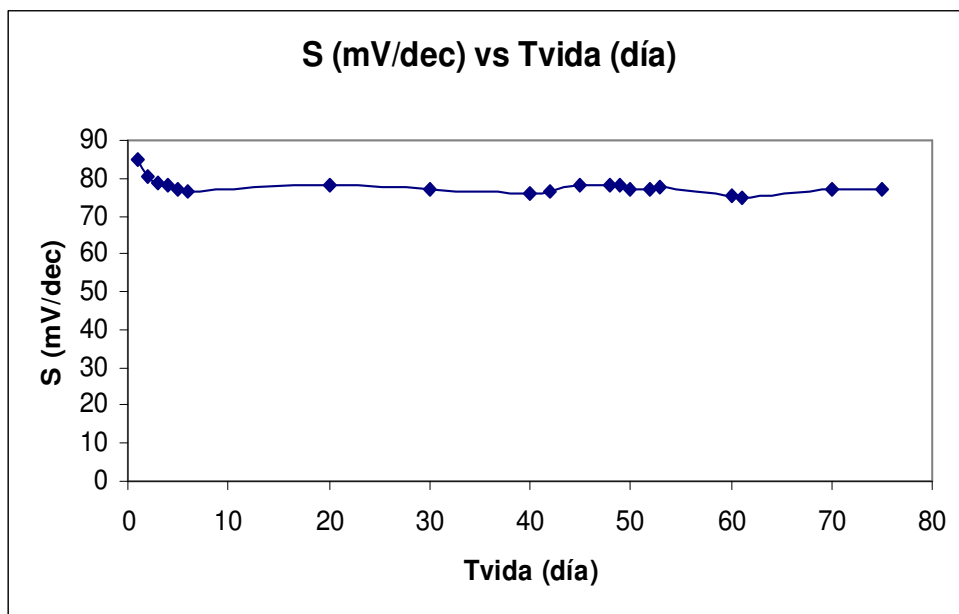


Figura IV.5 Sensibilidad S del ENFET814 en el Tiempo

La segunda característica es el tiempo de vida conseguido por el sensor durante el cual esta vigente. La explicación de la primera característica es que la enzima esta estabilizándose en la membrana enzimática debido a la presencia de algunas enzimas que no se han acoplado adecuadamente en dicha membrana y ofrecen estas variaciones debido a las reacciones químicas y procesos de difusión que se presentan en la membrana.

La explicación de la segunda observación es que el EDTA utilizado en la solución de almacenamiento esta cumpliendo su papel de mantener la actividad de la membrana enzimática durante todo el tiempo de actividad del dispositivo.

b. Ordenada en el origen

A partir de los resultados que aparecen en la Tabla IV.4 se aprecia que este valor (E^0) no permanece constante durante el tiempo de vida del dispositivo, apreciándose que siempre va en aumento y cuando las mediciones son consecutivas las variaciones tienden a ser constantes y aproximadamente igual a 3mV. La explicación a este hecho esta en función del tiempo de almacenamiento, tiempo de uso y decaimiento de la actividad enzimática en el tiempo; es necesario recordar que pequeñas variaciones de la pendiente originan variaciones apreciables en este parámetro y por tanto la pendiente es una manifestación del comportamiento de la membrana enzimática a las concentraciones que esta midiendo y esto depende de la reacción química que se produce y en donde influyen factores como parámetros de la solución tampón, pH tanto de la membrana como de la solución tampón que influirán sobre este parámetro y su variación.

c. Límite inferior de respuesta lineal (LIRL)

Se puede apreciar de la Tabla anterior, que el LIRL es de $3 \cdot 10^{-4}$ M y se mantiene constante durante todo el tiempo de vida del dispositivo.

d. Límite práctico de detección lineal (LPDL)

Al igual que en el caso anterior este parámetro es prácticamente constante durante el tiempo de vida del sensor, estando su valor comprendido entre $1.4 \cdot 10^{-4}$ a $1.8 \cdot 10^{-4}$ M.

e. Estabilidad de la respuesta

La estabilidad de la respuesta se puede considerar tomando en cuenta las oscilaciones de una lectura de potencial o también observando las derivas de dicha lectura a lo largo del tiempo. Considerando las variaciones de la lectura del potencial se apreció que eran del orden de ± 0.1 mV (ver figura IV.7 y IV.8).

IV.1.2.9.3 REPRODUCIBILIDAD DE LA RESPUESTA

Para observar la reproducibilidad o repetitividad de la respuesta del sensor se ha considerado las lecturas del potencial para una misma concentración perteneciente a la región lineal del dispositivo en días y mediciones sucesivas. Se ha escogido una concentración de $3 \cdot 10^{-4}$ M de urea en la solución tampón de 10mM, 150mM NaCl, pH 7.4. Esta concentración de urea pertenece al punto en donde se inicia la linealidad del dispositivo. El método aplicado consistió en introducir el ENFET en soluciones de concentración conocida e igual a $3 \cdot 10^{-4}$ M en diferentes instantes a lo largo de un día, procediendo a lavar los sensores después de cada inmersión en la solución de prueba, en nuestro caso específico se sumergió el ENFET en 5 oportunidades a lo largo de un día y otras 5 oportunidades a lo largo del siguiente día de tal manera que la repetitividad se presentaba en 10 inmersiones sucesivas. El resultado se aprecia en la Tabla IV.5 y representado en la figura IV.6.

NUMERO DE MEDICION	POTENCIAL ELECTRICO MEDIDO(V)	V-V _{MEDIA} (V) (V _{MEDIA} =-253.61V)
1	-253.85	-0.24
2	-253.54	0.07
3	-253.1	0.50
4	-252.95	-0.34
5	-253.25	0.36
6	-253.55	0.06
7	-253.65	-0.04
8	-253.85	-0.24
9	-253.96	-0.34
10	-253.7	-0.09

Tabla IV.5 Valores de potencial eléctrico medidos sobre una solución donde la concentración de urea es de $3 \cdot 10^{-4}$ M

En la Tabla IV.5 se observa que la desviación de los potenciales eléctricos medidos respecto al valor medio es como máximo del orden de ± 0.5 mV lo cual es aceptable en estos casos pudiendo explicarse esta variación por razones propias de la calibración realizada. Estas variaciones se representan en la figura IV.6.

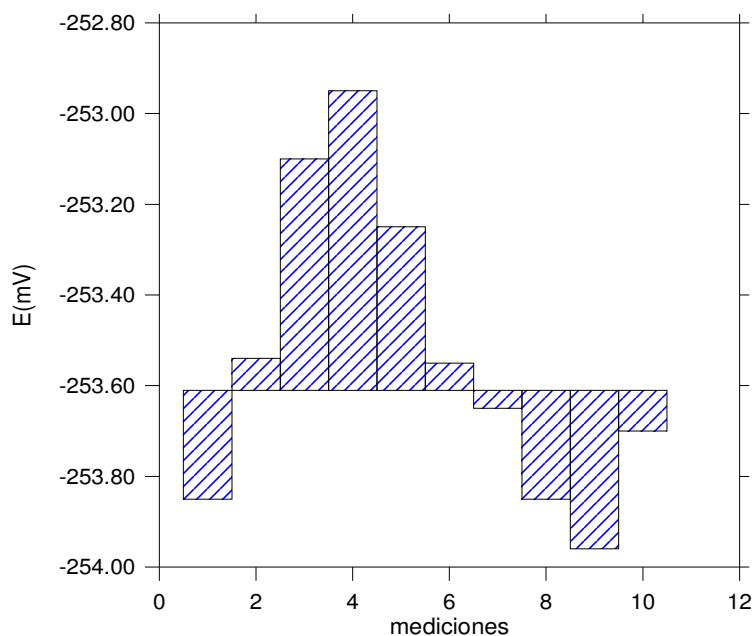


Figura IV.6 Prueba de repetitividad del ENFET813 en solución fosfatada 10 mM, 150 mM NaCl, pH 7.4 y concentración de urea $3 \cdot 10^{-4}$ M

IV. 1.2.9.4 CARACTERISITICAS DINAMICAS DE LA RESPUESTA

Para determinar las características dinámicas del sensor hemos considerado las respuestas o potencial eléctrico de salida del dispositivo como resultado de adicionar pequeñas cantidades de urea pura a la solución tampón fosfatada en la que se encuentra sumergido el dispositivo. Los tiempos de respuesta son variables dependiendo las adiciones que se utilizan y esto se puede apreciar en la figura IV.7 y de manera específica en la figura IV.8. La figura IV.7 es un registro continuo de la salida del ENFET de urea en el día número 70 de su trabajo y calibración. Se presenta el gráfico, que ha sido obtenido a partir del software LabVIEW, en donde se ha obviado los primeros 5406 seg debido a que este es el tiempo aproximado que se ha utilizado para estabilizar la membrana; esta cantidad no es necesaria porque la estabilización se consigue en un tiempo mucho menor, alrededor de 1500s; los primeros 50 μ L de urea se vierten en el instante 5300 s, esta cantidad de urea (y en

realidad los primeros 250 μL de urea pura de concentración 10^{-3} M) por ser de muy baja concentración y aún más diluyéndose en la solución tampón no generan ninguna

Registro continuo de la salida del ENFET814 el día 70 de pruebas

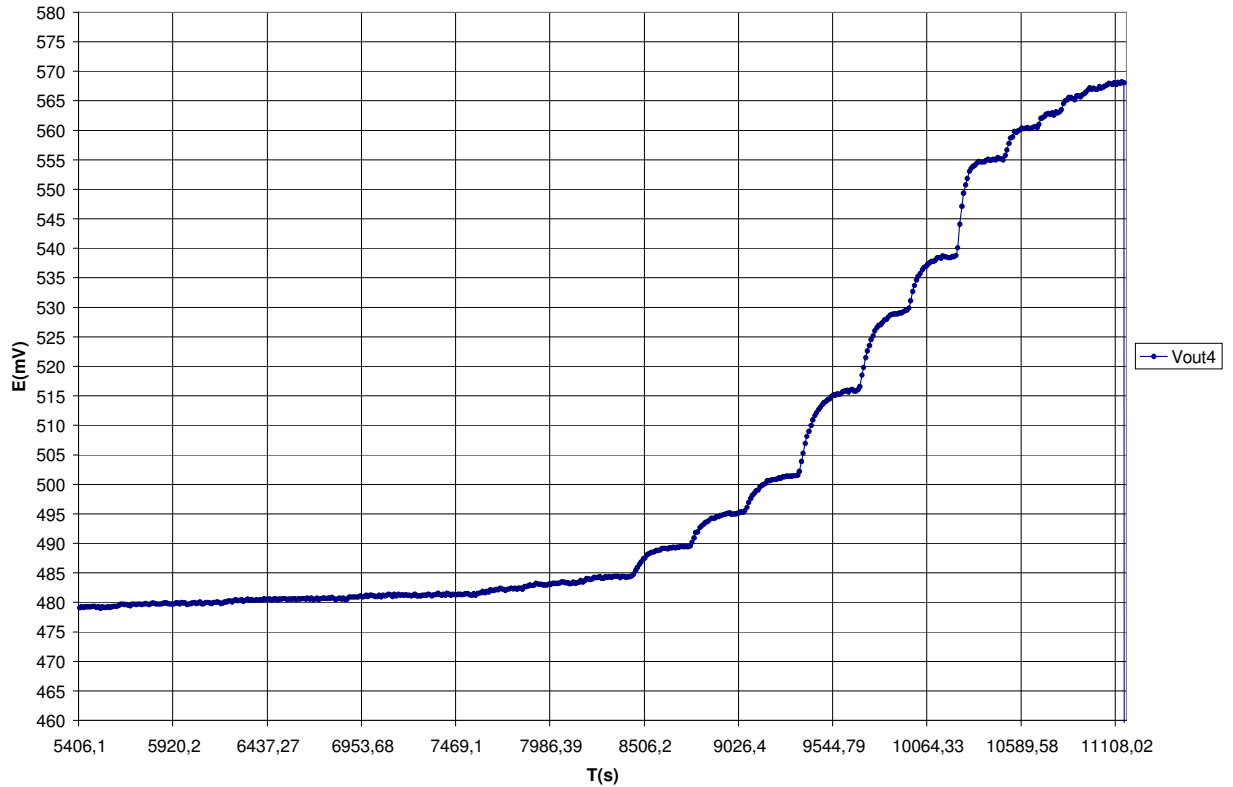


Figura IV.7 Registro continuo de la salida del ENFET814

variación apreciable en el potencial eléctrico de la puerta del ISFET. Se puede inducir viendo la figura IV.7 que las variaciones mientras no hay adición son muy pequeñas. Cada vez que existe adición de urea pura se presenta un “salto” o variación de potencial eléctrico.

La figura IV.8 muestra el salto de potencial que se produce cuando estando la solución tampón con urea pura a una concentración de $1 \cdot 10^{-3}$ M se vierte 25 μL de urea pura llevando la concentración de urea presente en la solución tampón a $2 \cdot 10^{-3}$ M siendo este el último peldaño de la región lineal del dispositivo. El tiempo de respuesta que se considera para este caso es el tiempo que emplea el dispositivo en alcanzar el 95% del nuevo valor de potencial, para este caso particular es de 90 s.

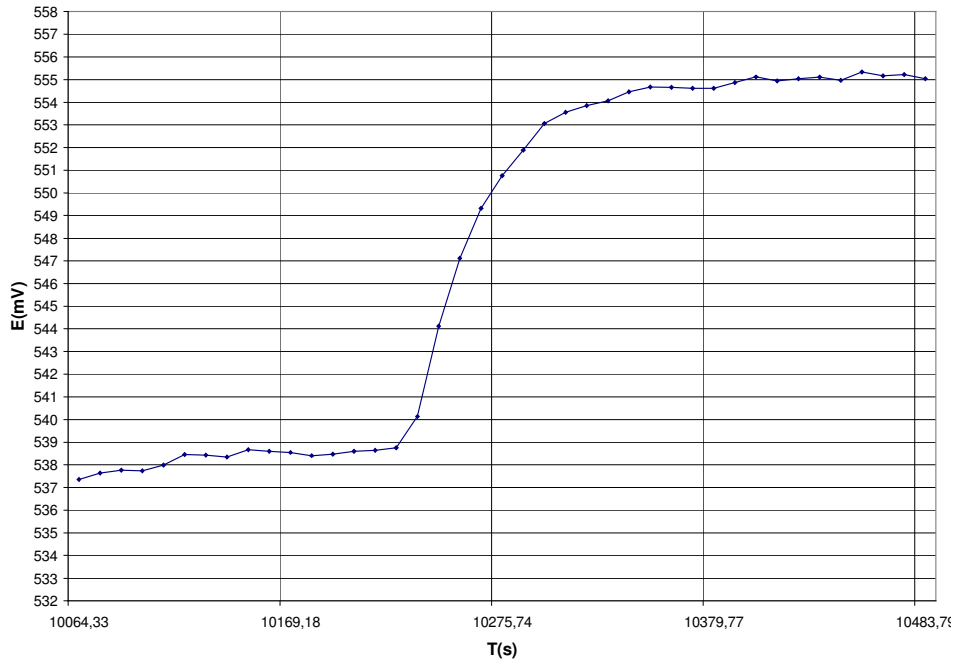


Figura IV.8 Tiempo de respuesta del ENFET814 para una variación de concentración de urea de $1 \cdot 10^{-3}$ a $2 \cdot 10^{-3}$ M

IV.1.3 SEGUNDA ETAPA: MEDICION DE LA CONCENTRACION DE UREA USANDO EL ENFET EN MUESTRAS REALES

Posteriormente a la obtención de un ENFET caracterizado se procede a la medición de la concentración de urea en muestras reales.

IV.1.3.1 PARTE EXPERIMENTAL

Se trabajará con muestras reales de líquido dializado conteniendo concentraciones de urea a determinarse mediante los ENFETs desarrollados con la metodología indicada en el punto IV.1.2.

El líquido dializado fué proporcionado por la Sección de Hemodiálisis del Hospital Parc Tauli de Sabadell, Barcelona. Esta sección entregaba potes de liquido dializado tomadas en diferentes instantes y extraídas a pacientes renales sometidos a hemodiálisis periódica.

IV.1.3.1.1 SISTEMA DE EVALUACION

Para realizar las mediciones de la concentración de urea en líquido dializado se ha utilizado el método de interpolación de mediciones consistente en medir los potenciales eléctricos en dos soluciones de tampón fosfatado con urea de concentración conocida y que se encuentren en el Rango Lineal de Detección, de esta manera se determina la sensibilidad del dispositivo. El siguiente paso es diluir la muestra proporcionada por el Hospital por un factor mínimo de 10 y se procede a introducir el ENFET en la solución diluida registrándose el potencial eléctrico el cual debe aparecer en la Región Lineal para proceder a extraer el valor de la concentración de la urea en el líquido dializado. El valor real se obtiene multiplicando el valor de la concentración de urea en el líquido dializado diluido por el factor de dilución utilizado.

IV.1.3.1.2 PARAMETROS DEL DISPOSITIVO

Al igual que para la primera etapa, en este caso las curvas obtenidas que representan la lectura del potencial respecto del logaritmo de la concentración de urea son obtenidas mediante el software GRAPHER, permitiendo observar algunos parámetros de interés previo cálculo, tales como la sensibilidad, estabilidad de la respuesta, características dinámicas de respuesta, reproducibilidad de la lectura de potencial que ya se encuentran definidos y son obtenidos en forma similar a lo mostrado en la primera etapa.

IV.1.3.2 RESULTADOS Y DISCUSION

En esta parte se hará una descripción de las características de respuesta del ENFET, básicamente las medidas del potencial eléctrico y la comparación con los resultados de las mediciones realizadas por el Laboratorio de Análisis Dr. Echevarne de Saint Cugat, Barcelona.

IV.1.3.2.1 ESTUDIO DEL METODO DE EVALUACION

Las mediciones de la concentración de urea en las muestras reales proporcionadas por el Hospital Parc Tauli se basan en la interpolación de mediciones utilizando soluciones tamponadas con dos valores conocidos de concentración de urea, a estas soluciones las llamaremos “soluciones de urea patrón” y registrando los potenciales

eléctricos que se presentan en cada uno de los dos casos. Para asegurar de trabajar en la región lineal del dispositivo, se procede a escoger los valores mínimo y máximo de concentración de urea para las “soluciones de urea patrón”, con este paso se obtiene la sensibilidad del dispositivo, a quien, por seguridad se lo ha sometido a medir los potenciales eléctricos hasta en dos oportunidades como mínimo para cada “solución de urea patrón” y obteniendo el valor promedio para los cálculos respectivos. Los valores obtenidos en las mediciones señaladas son prácticamente constantes como se podrá apreciar en la figura IV.10.

Posteriormente y, con la sensibilidad conocida, se procede a diluir la muestra real que contiene la urea en líquido dializado por un factor mínimo de 10. Esta dilución se considera necesaria para evitar fundamentalmente tres aspectos: la variación del pH de la muestra real impidiendo de esta manera que se mantenga constante durante la medición lo que impide la condición para las mediciones que indica que tanto el pH de la solución de trabajo como de la membrana enzimática deban ser constantes e iguales durante la medición; el segundo aspecto es evitar que la diferencia de intensidades iónicas impidan mediciones confiables y finalmente es posible que la colocación en directo del ENFET con la muestra real pueda dañar el dispositivo debido a la presencia de ciertos elementos en la muestra real. Una vez diluida la muestra real se procede a medir la concentración de la urea en ella introduciendo el ENFET y el electrodo de referencia en la solución a probar. Obtenido el potencial eléctrico se procede a realizar los cálculos con la sensibilidad previamente calculada del dispositivo y de esta manera se extrae el valor de la concentración de urea de la muestra real diluida; el último paso es aplicar el factor de dilución a los cálculos para obtener finalmente la concentración de la urea en el líquido dializado.

Los valores calculados son comparados con los obtenidos por el Laboratorio de Análisis Dr. Echevarne quién ha seguido un método de medición conocido como Método de Neumann y Ziegenhorn que consiste en la realización de una espectrofotometría de absorción molecular. La lectura bicromática a 340 nm de longitud de onda primario y 700 nm de secundaria. Este método utiliza reactivos específicos de la urea en un sistema tampón-enzima-sustrato. La calibración es automática para los sistemas implementados por Roche Diagnostic.

IV.1.3.2.2 PARAMETROS DE CALIBRACION

Las curvas obtenidas son aquellas que muestran los valores de potencial eléctrico en el tiempo para valores de concentración de urea de las “soluciones de urea patrón” y para las mediciones de concentración de urea en líquido dializado, proporcionadas por el HPT y preparadas para su determinación. El sistema utilizado para la determinación de la sensibilidad del dispositivo estuvo formado por: el ENFET y el electrodo de referencia introducidos en la solución tampón, KOH conteniendo NaCl agitada a velocidad constante, en esta solución se ha vertido urea pura en las siguientes cantidades: 250 μL de urea de 10^{-3} M, 225 μL de urea de 10^{-2} M y 50 μL de urea de 10^{-1} M con esta cantidad de urea vertida se tendrá una solución tamponada con urea y con una concentración de $3 \cdot 10^{-4}$ M que viene a ser el límite inferior de respuesta lineal de acuerdo a lo obtenido en la caracterización del ENFET en el punto IV.1.2.9.2.c y mostrado en la Tabla IV.4, esta solución resulta ser una de las “soluciones de urea patrón” a la cual llamaremos “solución de urea patrón A”; la siguiente “solución de urea patrón” (a la cual llamaremos “solución de urea patrón B”) se obtiene utilizando las siguientes cantidades de urea que serán adicionadas a la solución tampón: 250 μL de urea de 10^{-3} M, 225 μL de urea de 10^{-2} M y 225 μL de urea de 10^{-1} M y 25 μL de urea de 1 M, estas cantidades permitirán tener una solución tamponada con urea y con concentración de $2 \cdot 10^{-3}$ M.

La muestra real debe ser “preparada” para su medición, por esto se mide primeramente el pH que presenta, generalmente es mayor de 7.4 por lo cual se agrega pequeñas alícuotas de HCl que no llegan a sumar más de 25 μL para conseguir que el valor sea similar al que presenta la membrana enzimática, esto es 7.4. Posteriormente se “diluye” la muestra real en solución tampón por un factor mínimo de 10 y en él se introducen el ENFET y el electrodo de referencia para de esta manera proceder a registrar el valor del potencial eléctrico que estará en la región lineal de trabajo del dispositivo y que nos conducirá a la concentración de urea presente en la solución diluida.

a. Sensibilidad

De acuerdo a lo mencionado en el punto precedente se introduce el ENFET en la “solución de urea patrón A” cuya concentración es conocida y de valor $C_A = 3 \cdot 10^{-4}$ M obteniéndose un valor de potencial eléctrico E_{A1} . Después de lavar el ENFET se repite

esta operación hasta por dos veces más introduciéndolo en la misma “solución de urea patrón A”, comprobando la repetitividad de la lectura del potencial dado que los valores de los tres potenciales registrados (E_{A1} , E_{A2} , E_{A3}) varían en ± 0.4 mV. El valor del potencial eléctrico para esta solución patrón E_A , se obtiene promediando estos valores. El mismo procedimiento se sigue para obtener el potencial eléctrico E_B que resulta de introducir el ENFET en la “solución de urea patrón B”.

El valor de la sensibilidad S del ENFET se obtiene de la siguiente manera:

$$S = \frac{E_B - E_A}{\log C_B - \log C_A}$$

La Tabla IV.6 muestra de manera integral las mediciones de E_B , E_A y el potencial eléctrico para cuando se introduce en la solución que contiene la muestra real diluida.

b. Estabilidad de la respuesta

Las variaciones que muestran las señales estables que a su vez son sinónimas de que la reacción química entre enzima y sustrato han alcanzado el estado estable (saturación) son del orden de ± 0.3 mV tal como se aprecia en la figura IV.10.

IV.1.3.2.3 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE UREA EN LIQUIDO DIALIZADO

La muestra real proporcionada por el HPT se diluía por 10 ó más en solución tampón siendo la concentración real $C_{real} = N \cdot C_{U-dil}$ (N : factor de dilución y C_{U-dil} : concentración de urea diluida en solución tampón). Por tanto, el procedimiento para determinar la concentración de la urea de la muestra real es la siguiente:

1. Determinación del potencial eléctrico $E_{muestra}$ mediante el software LabVIEW con el cual se ha estado trabajando en toda esta experiencia. Este potencial eléctrico $E_{muestra}$ se obtiene al introducir el ENFET y el electrodo de referencia en la solución diluida que contiene la urea.

2. Aplicación de la siguiente expresión para determinar la C_{u-dil}

$$\frac{E_{muestra} - E_A}{\log C_{u-dil} - \log C_A} = S$$

Por tanto:

$$C_{u.dil} = 10^{\frac{E_{muestra} - E_A + \log C_A}{S}}$$

3. Determinación de la concentración real C_{real} de la urea en la muestra real mediante (N: factor de dilución):

$$C_{real} = N \cdot C_{u-dil}$$

Utilizando estos pasos se ha obtenido los siguientes resultados:

E_A	E_B	S	$E_{MUESTRA}$	C_{U-DIL}	N	C_{REAL}
478,16	540.75	75.98	490.7	$4,38 \cdot 10^{-4}M$	26	$11,3 \cdot 10^{-3}M=67,8mg/dL$
481,32	540.12	71.37	497.2	$5 \cdot 10^{-4}M$	15	$7,5 \cdot 10^{-3}M=45mg/dL$
489,50	547.75	70.70	491.5	$3,2 \cdot 10^{-4}M$	17	$5,4 \cdot 10^{-3}M=32,4mg/dL$
491,05	550,20	71,79	489,0	$2,8 \cdot 10^{-4}M$	11	$30,8 \cdot 10^{-3}M=18,4mg/dL$

Tabla IV.6 Valores medidos para la concentración de urea de las muestras reales

Los errores de estas mediciones respecto de los valores medidos por el Laboratorio de Análisis Dr. Echevarne (C_{LAB}) fueron los siguientes:

C_{REAL}	C_{LAB}	ERROR
67,8mg/dL	67mg/dL	1,19%
45mg/dL	43mg/dL	4,65%
32,4mg/dL	30mg/dL	8%
18,4mg/dL	17mg/dL	8,2%

Tabla IV.7 Determinación de errores

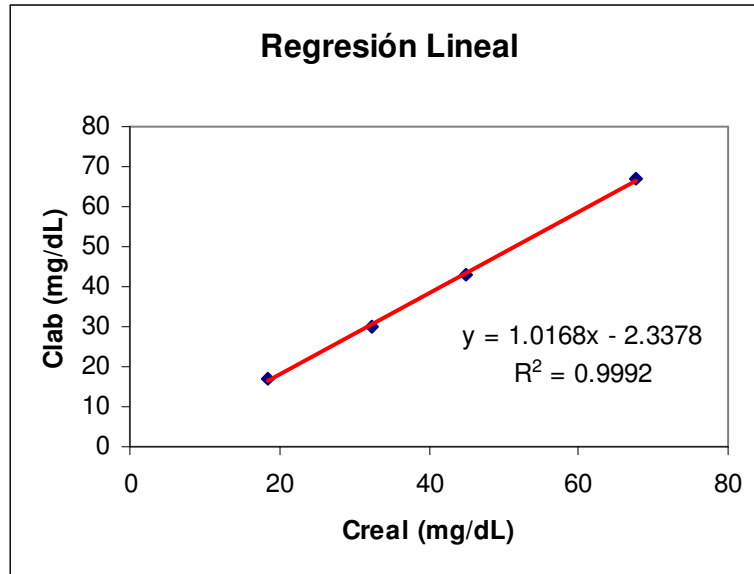


Figura IV.9 Recta de regresión CREAL respecto a CLAB

La figura IV.9 muestra la correlación entre los valores de la concentración de urea (C_{REAL}) medidos por el ENFET desarrollado en el presente trabajo de Tesis y los valores de la concentración de urea medidos por el Laboratorio de análisis Dr. Echevarne de Saint Cugat (C_{LAB}).

En análisis clínicos se acepta tasas de error de hasta 10%.

La figura IV.10 muestra el comportamiento de dos ENFETs (enfet813 y enfet814) que “miden” en forma indirecta concentración de urea en una muestra real. Se aprecia las curvas de la calibración de los ENFETs tanto en la “solución de urea patrón A” cuya concentración es conocida y de valor C_A (en la figura se designa como “medida de C_A ”) como en la “solución de urea patrón B” cuya concentración es conocida y de valor C_B (en la figura se designa como “medida de C_B ”). Estas mediciones de calibración se han hecho en este caso en dos oportunidades para probar la repetitividad de los resultados; luego aparecen las curvas que corresponden a las medidas de la concentración de urea en muestra real designadas como “medida de [urea] en POTE 1” y “medida de [urea] en POTE 2” igualmente estas mediciones se realizan en tres oportunidades para comprobar la repetitividad de los resultados.

Esta gráfica es importante porque se constata la confiabilidad de los ENFETs implementados en el presente trabajo.

Medida de [urea] con los ENFET813 y 814

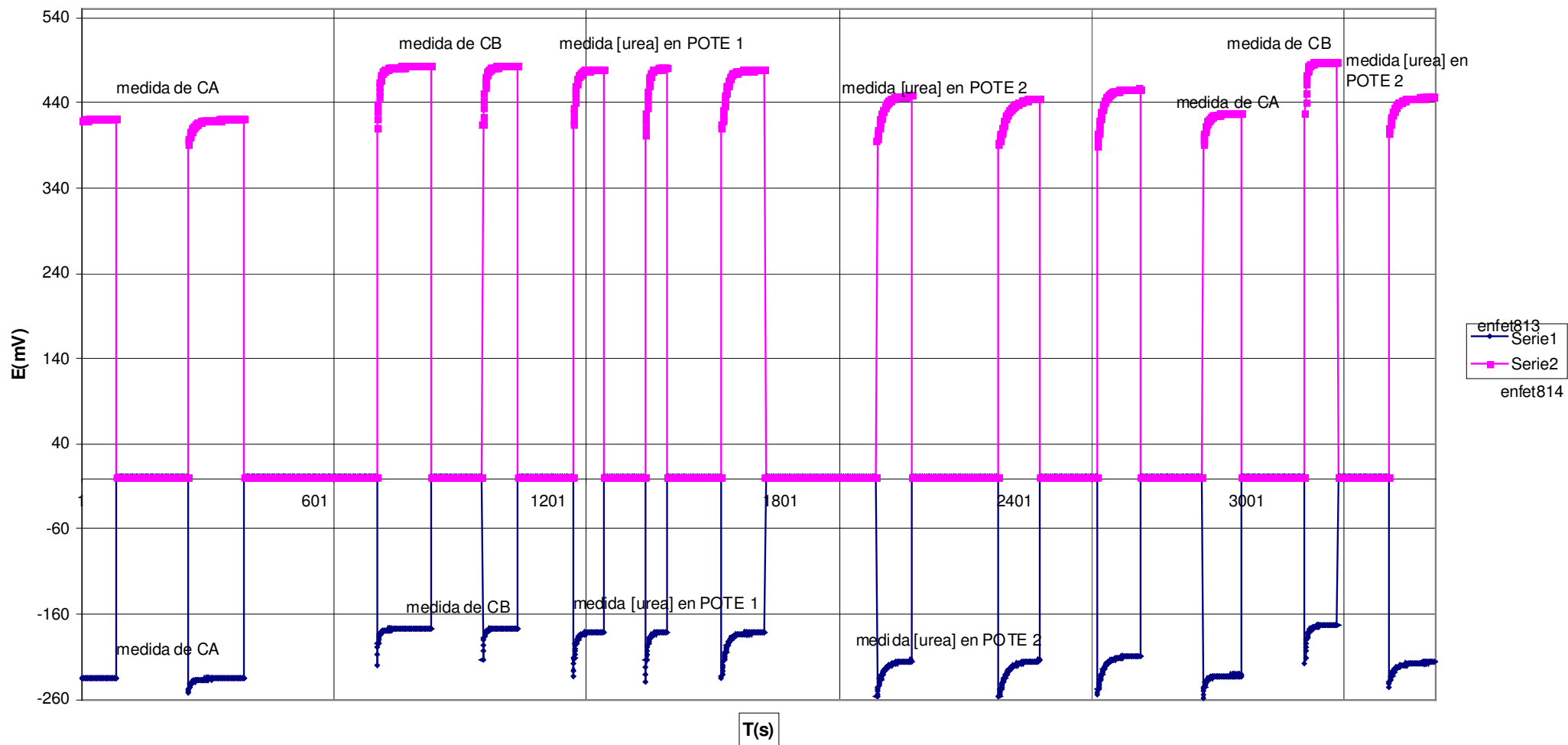


Figura IV.10 Mediciones de las concentraciones de urea en líquido dializado mediante dos ENFETs: ENFET813, ENFET814

CAPITULO V: CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas de la realización del presente trabajo de Tesis son las siguientes:

1. Se ha desarrollado un ENFET para aplicarlo a la medición indirecta de la concentración de urea en muestras reales de pacientes sometidos a diálisis periódica. Para ello se ha utilizado como transductor un ISFET fabricado en el Instituto de Microelectrónica de Barcelona del CNM, compatible con la tecnología CNM096 y CNM112, generando una membrana enzimática con la ureasa como enzima y realizando la deposición directa de esta membrana sobre el ISFET.

2. Se han optimizado los valores de los componentes de la membrana enzimática con vistas a obtener los mejores resultados y que el proceso de formación de la membrana enzimática tenga carácter repetitivo. Estos son:

90 μ l de solución tampón fosfatada, KOH 10mM con EDTA 1mM; pH 7.4

10 μ l de Glycerol

7 mg de BSA

6.5 mg de Ureasa

Tiempo de exposición al glutaraldehído, del ISFET con la membrana enzimática ya depositada sobre el óxido del dispositivo: 1hr20min

Tiempo de evaporación en el medio ambiente del glutaraldehído: 20 min

Tiempo de lavado del EnFET: 20 min

Temperatura de almacenamiento de la membrana enzimática: -20 °C

3. Se ha caracterizado el proceso de formación de la membrana enzimática, así como la técnica de inmovilización de la enzima ureasa y la “fijación” de ésta sobre el transductor.

4. Se ha conseguido una solución tampón que regula el pH ante la reacción de descomposición de dióxido de carbono y amoníaco que se produce en el interior de la membrana enzimática lo que pueden ser causa de variación del pH debido a las propiedades ácido-base de estos productos. En general, para el estudio de los ENFETs es necesario contar con soluciones tampón que permitan el trabajo adecuado del dispositivo evitando afectar la respuesta del transductor y desnaturalizar la enzima.

5. Para la obtención de la solución tampón adecuada, se ha considerado la adición de NaCl por ser este un elemento presente de manera notoria en la sangre y en el líquido de dializado (cloruro sódico: 206.605 g; Na⁺: 140.0 mmol/L; Cl⁻: 106.0 mmol/L) lo cual al interactuar con la membrana enzimática genera interferencias que influyen en la respuesta del sensor observándose señales atenuadas respecto a las señales que se obtienen cuando no está presente esta solución de NaCl.

6. Las características del ENFET desarrollado y que otorga las mejoras prestaciones para pruebas en laboratorio con muestras ideales y reales de urea son:

Solución de trabajo: Solución tampón fosfatada, concentración 10mM, 150mM NaCl, pH 7.4

Sensibilidad (mV/dec urea): 77.02

Límite inferior de respuesta lineal: $3 \cdot 10^{-4}$ M

Rango lineal de Detección: $3 \cdot 10^{-4}$ M - $2 \cdot 10^{-3}$ M

Tiempo de respuesta: 90s

Estabilidad del potencial: ± 0.3 mV

Tiempo de vida: 75 días

7. La sensibilidad del ENFET que se muestra en el punto anterior es un valor promedio de las sensibilidades mostradas por el dispositivo en todo el tiempo de trabajo observándose que la desviación de las sensibilidades respecto al valor promedio es del orden de -1.78mV a -2.14mV lo que significa que las variaciones son del orden de -1.27% a -2.7% lo cual muestra un dispositivo confiable respecto a estabilidad.

8. Los ENFETs desarrollados fueron sometidos a pruebas de reproducibilidad o repetitividad de la respuesta observándose que satisfacen ampliamente los requerimientos consistentes en que se obtienen valores de potencial eléctrico de valores similares en 10 mediciones efectuadas en dos días consecutivos. La desviación de los valores medidos respecto al valor promedio (253.61mV) aparece entre -0.34mV a 0.50mV. Estos valores del potencial eléctrico que aparece en la interfase membrana enzimática-óxido del ISFET, prácticamente constantes, y que esta relacionado en forma indirecta con la concentración de urea en la solución, permiten asegurar el buen desempeño del ENFET en pruebas reales en trabajo continuo.

9. El pretratamiento de la muestra real de urea es un paso necesario para proceder a la determinación de la concentración de urea. La dilución de la muestra permite no solamente desplazar la concentración de la urea real a valores que se ubicarán en la zona lineal y de “detección” del ENFET sino que permite tener un pH constante durante todo el proceso de medición. Además se consigue impedir que la diferencia de intensidades iónicas impidan mediciones confiables y finalmente la dilución impide que el ENFET sea dañado al ser puesto en contacto directo con muestras reales.

10. Se ha conseguido caracterizar un proceso para la medición de la concentración de urea en muestras reales consistente en diluir la muestra real de urea procedente de la evacuación que realiza un paciente sometido a diálisis periódica, determinación de la sensibilidad del ENFET usando dos valores denominados máximo y mínimo de concentración de urea patrón (urea pura) ubicados en los extremos de la respuesta lineal del ENFET para luego proceder a medir la concentración en la muestra real diluida. Finalmente se aplica el factor de dilución al valor obtenido y de esta manera se obtiene el valor final de la muestra real. Posteriormente el ENFET es lavado en solución tampón y EDTA agitada y se guarda a 4°C en solución tampón con EDTA para una próxima medición.

11. El ENFET desarrollado en el presente trabajo de Tesis implica cantidad de insumos muy reducidos siendo el único elemento de mayor costo el ISFET. Pensando en una producción masiva los precios podrían reducirse drásticamente consiguiéndose tener ENFETs para medición indirecta de urea a costes por debajo de los 12 euros.

12. El ENFET generado es de fácil industrialización. Su tiempo de vida es superior a dos meses y medio utilizando la misma membrana enzimática, lo que permite su almacenamiento.

13. La eficiencia del EnFET para la medida indirecta de la concentración de urea en sangre a partir de la medida de la concentración de urea en el líquido dializado queda demostrada al comprobar que los valores de las mediciones están adecuadamente correlacionadas con las medidas realizadas por un laboratorio que sigue procesos tradicionales de medición de la concentración de urea.

14. El dispositivo se ha validado en aplicación realizando medidas de concentración de urea en muestras de líquido dializado de pacientes del Hospital Parc Tauli

recogidas en distintas etapas del proceso de diálisis y procediendo a comparar y hacer las correlaciones respectivas con los valores medidos sobre las mismas muestras por personal clínico especializado en el trabajo con pacientes renales y sometidos a diálisis frecuente.

15. Con los resultados satisfactorios que se han obtenido se tiene el camino expedito para integrar todo un sistema que además del sensor antes descrito también considere la electrónica de procesamiento de la señal apuntando a distintos objetivos: (1) Disponer de medidas continuadas del proceso de hemodiálisis que permitan objetivar la calidad del mismo. (2) Personalizar el proceso dependiendo de las características particulares de cada paciente y también de las condiciones específicas en que se encuentre en el momento de iniciar cada tratamiento periódico, ya que la ingesta, el estado físico, el ejercicio realizado, etc. en los días inter-proceso, influyen notablemente en la necesidad de un mayor o menor tiempo de proceso (3) Adecuar la velocidad de extracción a las necesidades puntuales consiguiendo menores tiempos de diálisis y evitando el riesgo de pérdidas bruscas de presión, mareos, etc.

16. Como trabajo futuro que se desprende de la presente Tesis es la automatización de todo el proceso de preparación de la membrana enzimática, caracterización del ENFET y uso en muestras reales, los valores y la caracterización realizada permiten que este siguiente paso es factible y necesario.

17. Se propone también como futuro desarrollo tecnológico en esta línea la integración del ENFET con las etapas de tratamiento de datos y presentación de resultados en un MEM.