

14/14



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

**DISEÑO Y CONSTRUCCION DE UN
ELECTRODO ENZIMATICO PARA
LA MEDICION DE GLUCOSA**

T E S I S

Que para obtener el título de:

F I S I C O

P r e s e n t a :

Francisco Salomón Caloca Torres



México, D. F.

1988



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Introducción

CAPITULO 1. DESCRIPCION DEL ELECTRODO ENZIMATICO

Resumen	(pag. 1)
1.1 Funcionamiento básico del electrodo enzimático	(pag. 2)
1.2 Posibilidades de medición para el electrodo enzimático	(pag. 2)
1.2.1 Detección de glucosa por consumo de oxígeno	(pag. 3)
1.2.2 Detección de glucosa por pH	(pag. 3)
1.2.3 Medición de glucosa por H_2O_2	(pag. 3)
1.3 Detección de peróxido de hidrógeno	(pag. 4)
1.4 Materiales usados como electrodos	(pag. 5)
1.4.1 Electrodo de referencia	(pag. 6)
1.4.2 Electrodo de trabajo	(pag. 6)
1.5 Principio de medición para glucosa	(pag. 8)
1.6 Partes del sistema de medición	(pag. 10)
1.6.1 Cámara de dilución y mezclado	(pag. 11)
1.6.2 Detector de peróxido de hidrógeno	(pag. 13)
1.6.3 Membrana enzimática	(pag. 13)
1.6.4 Electrónica desarrollada	(pag. 16)

CAPITULO 2. VARIABLES IMPORTANTES EN LA OBTENCION DE LA SEÑAL

Resumen	(pag. 26)
2.1 Dependencia con la temperatura	(pag. 27)

2.1.1 Efecto de la actividad y estabilidad de la enzima	(pag. 27)
2.2 Dependencia con el voltaje de polarización	(pag. 31)
2.3 Dependencia del pH en la respuesta	(pag. 34)
2.4 Agitación	(pag. 35)
2.5 Limitantes a la linealidad	(pag. 36)
2.5.1 Cantidad de enzima activa	(pag. 36)
2.5.2 Oxígeno disuelto	(pag. 37)

CAPITULO 3. MODELO PARA LA SIMULACION DE UN ELECTRODO

ENZIMATICO PARA GLUCOSA

Resumen	(pag. 40)
3.1 Hipótesis para la formulación del modelo	(pag. 41)
3.2 Etapas para el desarrollo del modelo	(pag. 42)
3.3 Descripción de la primera parte del modelo	(pag. 44)
3.3.1 Parámetros. Variables de entrada y salida	(pag. 44)
3.3.2 Hipótesis para la primera etapa de simulación	(pag. 45)
3.3.3 Simulación por diferencias finitas parte 1	(pag. 46)
3.3.4 Obtención de la ecuación de diferencias	(pag. 49)
3.3.5 Estabilidad del método numérico	(pag. 50)
3.3.6 Incremento de tiempo entre iteraciones	(pag. 51)
3.3.7 Lectura en el electrodo	(pag. 51)
3.3.8 Cambios de la concentración en la cámara de medición	(pag. 52)
3.3.9 Descripción del programa para la simulación de un electrodo para peróxido	(pag. 53)
3.3.10 Obtención del coeficiente de difusión de peróxido	(pag. 53)

3.4	Descripción de la segunda parte de la formulación	
.	del modelo	(pag.56)
3.4.1	Parámetros. Variables de entrada y salida	(pag.57)
3.4.2	Hipótesis para la construcción del modelo parte 2	
.		(pag.58)
3.4.3	Simulación numérica de la parte 2 del modelo	(pag.59)
3.4.4	Obtención de la ecuación de diferencias	(pag.60)
3.4.5	Concentración de peróxido en la zona enzimática	
.		(pag.62)
3.4.6	Cambio de la concentración de glucosa en la cámara	
.	de dilución	(pag.63)
3.4.7	Sincronización de los procesos de difusión	(pag.63)
3.4.8	Lectura equivalente en el electrodo	(pag.64)
3.4.9	Descripción del programa para la simulación	
.	etapa 2 del modelo	(pag.66)
3.4.10	Obtención del coeficiente de difusión de glucosa	
.		(pag.66)
3.5	Descripción de la tercera parte del modelo	(pag.69)
3.5.1	Parámetros. Variables de entrada y salida	(pag.71)
3.5.2	Hipótesis para la simulación de la parte 3	(pag.72)
3.5.3	Simulación por diferencias finitas parte 3	(pag.73)
3.5.4	Ecuación de diferencias	(pag.73)
3.5.5	Función de actividad	(pag.74)
3.5.6	Sincronización de los procesos	(pag.76)
3.5.7	Cambios de las concentraciones en la cámara de	
.	medición	(pag.77)
3.5.8	Cambios de las concentraciones en la zona enzimática	
.		(pag.77)

3.5.9 Concentración de peróxido en la zona enzimática	(pag. 78)
.	
3.5.10 Corrección de oxígeno en la zona enzimática	(pag. 79)
3.5.11 Corrección de glucosa en la zona enzimática	(pag. 80)
3.5.12 Oxígeno entregado por el electrodo	(pag. 80)
3.5.13 Descripción del programa para la simulación de la	
. parte 3 del modelo	(pag. 81)
3.5.14 Resultados	(pag. 83)

CAPITULO 4. CARACTERIZACION Y EVALUACION EN HOSPITAL

Resumen	(pag. 85)
4.1 Caracterización	(pag. 86)
4.2 Evaluación en laboratorio	(pag. 88)
4.2.1 Sensibilidad	(pag. 88)
4.2.2 Reproducibilidad	(pag. 90)
4.2.3 Estabilidad en la medición	(pag. 90)
4.2.4 Tamaño de la muestra	(pag. 92)
4.2.5 Tiempo de muestreo	(pag. 92)
4.2.6 Tiempo de análisis	(pag. 96)
4.3 Evaluación en hospital	(pag. 96)
4.3.1 Medición de glucosa en sangre	(pag. 96)
4.3.2 Separación del suero en la muestra de sangre	(pag. 96)
4.3.3 Calibración	(pag. 98)
4.3.4 Control de calidad	(pag. 100)
4.3.5 Sensibilidad	(pag. 100)
4.3.6 Precisión	(pag. 102)
4.3.7 Exactitud	(pag. 102)
4.3.8 Especificidad	(pag. 105)

4.3.9 Medición de glucosa en Plasma y sangre completa

(pag. 105)

CONCLUSIONES (pag. 108)

APENDICE (pag. 110)

REFERENCIAS (pag. 115)

I N T R O D U C C I O N

La glucosa es una molécula indispensable para la vida y constituye la principal fuente de energía para el cuerpo humano; además que su concentración en sangre periférica, refleja en gran medida la capacidad del cuerpo humano para su síntesis, permitiendo la detección y control de la Diabetes Mellitus (ref. 21). Su importancia hace que este análisis, sea el más realizado por cualquier laboratorio de química clínica del mundo.

De entre las ocho variables más frecuentemente cuantificadas por laboratorios clínicos, la medición de glucosa constituye más del 40% del total de los análisis realizados por laboratorios de hospitales relativamente grandes (ref. 22). Esto ha generado un mercado que ha impulsado a su vez, el desarrollo de diversas metodologías para la cuantificación de esta sustancia.

Existen tres fundamentos en los instrumentos para la medición de glucosa.

-El primero de ellos, está constituido por aparatos que utilizan como principio funcional un cambio de color en la muestra; resultante de la interacción con sustancias reductoras como la Ortotoluidina. Esta reacción aparte de ser inespecífica, es lenta y laboriosa por lo que no puede ser automatizada.

-En el segundo grupo están los instrumentos que cuantifican a la glucosa por medio de una reacción

enzimática (Glucosa Oxidasa, Glucosa Deshidrogenasa, Hexocinasa), la cual genera productos detectables a 340 nm por métodos espectrofotométricos. Este método supone que la absorbancia de la muestra a una fuente de luz cercana a los 340 nm, es proporcional a su concentración de glucosa.

-El tercer grupo, de más reciente aparición, está formado por equipos capaces de detectar compuestos electroactivos (ion selectivos) acoplados a reacciones enzimáticas. Dentro de este grupo con el uso de la enzima glucosa oxidasa, la determinación puede llevarse a cabo por medio de electrodos para la medición de O_2 , pH, o de H_2O_2 . Actualmente existen instrumentos desarrollados en los Estados Unidos, Japón, Hungría, Francia y Alemania; sin embargo, aún no se conocen en nuestro medio.

Con objeto de evitar la dependencia tecnológica transnacional, con todo lo que implica tanto desde el punto de vista de importación, costo, mantenimiento, etc. el grupo de Biotecnología del Centro de Instrumentos UNAM, al cual pertenezco y el Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología UNAM, integró un proyecto para desarrollar un analizador electroenzimático de glucosa capaz de competir ventajosamente con los de importación, tanto en sus características de confiabilidad como de aplicabilidad a nivel clínico (ref 23,24).

De esta forma, este trabajo de tesis se planteó con el objeto de formalizar el desarrollo y funcionamiento del electrodo enzimático, así como realizar su caracterización y

evaluación de campo en el área clínica. Esto último con el fin de determinar su utilidad en la medición de glucosa en laboratorios clínicos.

El presente trabajo está compuesto de cuatro capítulos, los cuales serán descritos brevemente a continuación:

En el capítulo 1, se lleva a cabo la descripción del principio de funcionamiento del electrodo enzimático, así como el desarrollo de su fabricación; y en el se concluye que el uso de oro como electrodo de trabajo y plata como electrodo de referencia, resultan convenientes en la detección de peróxido de hidrógeno.

El capítulo 2, trata de las variables que más afectan la respuesta del electrodo enzimático en condiciones normales, estudio importante para determinar sus valores más adecuados. En este capítulo se obtienen algunos valores óptimos de operación como lo son Temperatura=37 C, pH=7, Voltaje de operación=.7 Volts.

El capítulo 3, consiste en la formulación de un modelo para la representación del electrodo enzimático. El modelo está basado en un proceso de difusión en una dimensión para cada una de las especies manejadas (glucosa, peróxido, oxígeno) y por la ecuación de Michaelis en lo referente a la velocidad de reacción promedio de la enzima, a la que se llamará "actividad enzimática". Como conclusión a este capítulo, podría decirse que este modelo representa bien el comportamiento observado experimentalmente; y predice que el estado estacionario observado en la medición de altas concentraciones de glucosa, es posiblemente debido al

transporte de oxígeno. Resultado que es observado experimentalmente, cambiando las condiciones de oxigenación de la muestra de glucosa a medir.

El cuarto y último capítulo, consiste en la caracterización y evaluación del electrodo enzimático en el área clínica. En esta prueba, las muestras a analizar son suero, plasma y sangre completa, tomadas de pacientes para análisis de rutina. Los resultados obtenidos en esta evaluación, fueron comparados contra el método de Glucosa Oxidasa-Glucosa Deshidrogenasa, usado normalmente en la medición de glucosa.

Como resultado de la correlación encontrada entre los dos métodos de medición, se pudo concluir que ambos métodos son prácticamente indistinguibles y por tanto, el electrodo enzimático es recomendable en la medición de este tipo de muestras.

CAPITULO 1

DESCRIPCION DEL ELECTRODO ENZIMATICO.

RESUMEN

En este capítulo, se muestra el funcionamiento básico del electrodo enzimático para la medición de glucosa, la electrónica desarrollada para la medición, así como los intentos en la obtención de los materiales para los electrodos del detector de peróxido de hidrógeno (plata, platino, grafito, oro depositado electrolíticamente, oro puro), en los cuales debía encontrarse, una alta estabilidad de la medición en el tiempo, además de favorecer la detección del peróxido de hidrógeno.

Como resultado, se encontró que el uso de la plata como electrodo de referencia y el oro puro (24 K) como electrodo de trabajo, resulta muy conveniente, debido a su adquisición nacional, y a su alta estabilidad en la medición de peróxido de hidrógeno.

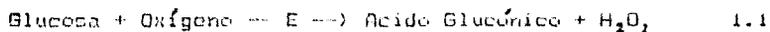
1.1 Funcionamiento básico del electrodo enzimático.

Las enzimas son proteínas, usadas por los organismos como ajustadores de las rutinas metabólicas (ref 10 Cap.8).

Entre los atributos más importantes de las enzimas, se encuentran su especificidad y su enorme poder catalítico (ref 2 Cap.14-5), que las hacen muy atractivas para usarlas como enlace en la detección de algunas sustancias de interés (Mancini y Guilbault 1986 ref.14): Ver anexo 4.

El grupo de enzimas llamadas OXIDASAS, que generan en su acción catalítica peróxido de hidrógeno, es de especial interés, pues puede servir de enlace entre la sustancia a la que es específica y un detector de peróxido de hidrógeno.

En el caso particular que nos ocupa, la enzima llamada GLUCOSA OXIDASA, cataliza a la glucosa según la ecuación:



1.2 Posibilidades de medición para el electrodo enzimático

En la ecuación 1.1 puede verse que con el uso de la enzima Glucosa Oxidasa, la determinación de la glucosa puede cuantificarse mediante el consumo de oxígeno disuelto, el cambio de pH debido a la presencia del Acido Glucónico, o la detección de peróxido de hidrógeno. Para cada una de las anteriores opciones existen trabajos reportados, por lo que fué necesario el plantear las conveniencias e inconveniencias de cada método para continuar con el desarrollo del electrodo enzimático.

1.2.1 Detección de glucosa por consumo de oxígeno.

Este método de medición fue el primero reportado como un electrodo enzimático en 1962 por Clark y Lyons (ref 28), dando origen a una carrera en el desarrollo de estos electrodos.

La medición de oxígeno tiene por desventaja el ser una medida relativa al nivel inicial de oxígeno, haciendo críticas las condiciones de aereación y difícil su reproducción. Lo anterior está unido a la baja solubilidad de oxígeno en agua, que fácilmente puede hacer llevar su nivel a cantidades no medibles por electrodos normales.

1.2.2 Detección de glucosa por pH

Este método, también ha sido empleado en la detección de glucosa, como en el reporte de Nilsson y Akerlund (1973) (ref 29).

La medición del cambio de pH por la liberación de Acido Glucónico tiene por desventajas: que el pH debe ser estable para mantener la actividad enzimática constante (Anthony E.G. Cass, Graham Davis 1984 ref.11), que es difícil la medición de cambios pequeños y el que este tipo de electrodo sea frágil.

1.2.3 Detección de glucosa por H_2O_2 .

Este proceso junto con la medición del consumo de oxígeno, son los transductores más empleados en equipos

comerciales similares, con el uso de platino como electrodo de trabajo.

La medición de peróxido de hidrógeno comparte el problema de la baja solubilidad del oxígeno en el agua, pero como ventajas tiene la gran actividad del peróxido, que es fácilmente medible por métodos electroquímicos normales, además de poder referir la concentración inicial como cero y no necesitar de una membrana adicional ni del uso de electrolito como en el caso del electrodo de oxígeno. Esto está unido a que muy pocas sustancias pueden reaccionar a los potenciales usados en los electrodos, resultando medidas prácticamente selectivas para el peróxido de hidrógeno (Hickling y Wilson 1951 ref.12).

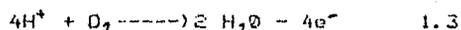
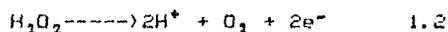
Después de lo anterior, se decidió encaminar el desarrollo del electrodo enzimático vía la detección de peróxido de hidrógeno.

1.3 Detección de peróxido de hidrógeno.

La detección de peróxido de hidrógeno puede llevarse a cabo con el uso de un electrodo amperométrico, formado por un par de metales, uno de trabajo y otro de referencia, sometidos a una diferencia de potencial constante (ref. 12). De esta forma, la corriente medida entre la fuente de voltaje y el electrodo, es proporcional (ver linealidad al peróxido de hidrógeno pag.88) a la concentración de peróxido de hidrógeno en la superficie del electrodo.

La detección de peróxido, está fundamentada en su

descomposición en iones y su reacción en los electrodos según las ecuaciones:



en estas ecuaciones, se observa después de balanceadas que son complementarias en la carga generada. Carga que al ser transportada gracias a la diferencia de potencial externo entre los electrodos (ref.5 Cap.11.4), genera una corriente que es la señal entregada por el detector. De las ecuaciones 1.2 y 1.3, se deduce que por cada molécula de peróxido que reaccione en el electrodo, deberán circular la carga equivalente a 2 electrones (ref.3 Cap.1); por lo que de la corriente entregada por el electrodo, es posible saber el número de moléculas reaccionando. Si suponemos que la reacción es instantánea y la concentración homogénea, podemos entonces saber la concentración de peróxido en la región cercana al electrodo, como función directa a la corriente medida.

1.4 Materiales usados como electrodos.

Debido a que los electrodos no sólo funcionan como suministro de portadores libres de carga, sino que intervienen en la reacción en la disociación y reagrupamiento de iones (ref.4 Cap.11-3), es importante el encontrar materiales adecuados que sean estables en el

tiempo y que favorezcan la medición del peróxido de hidrógeno. Esto llevó a iniciar la investigación bibliográfica en el tema y a probar los diferentes materiales reportados para encontrar el que nos fuera más adecuado. A continuación se expondrán los materiales usados como electrodos y los resultados obtenidos con su empleo.

1.4.1 Electrodo de referencia.

En el estudio de la respuesta de diferentes electrodos, Leland y Clark (1976) (ref.13) indican que el metal más frecuentemente usado como electrodo de referencia, es la plata. Esto es muy importante en el momento de comparar resultados con la literatura, que unido a su maleabilidad y fácil adquisición, lo hacen muy atractivo como electrodo de referencia; decidiendo su empleo con este fin.

1.4.2 Electrodo de trabajo.

En el trabajo anterior Leland y Clark (1976), se menciona que los materiales más frecuentemente usados como electrodos de trabajo son el platino, el carbón y el oro, los cuales fueron probados para determinar cual es el más adecuado en su uso como electrodo de trabajo. Los resultados obtenidos, serán expuestos a continuación.

a) Electrodo de platino.

Las experiencias obtenidas con el platino como electrodo de trabajo, hacen pensar que no es el material más adecuado.

Se observó que el electrodo perdía rápidamente sensibilidad, haciéndolo poco reproducible; además de ser muy sensible a la agitación y difícil su adquisición nacional en estado puro.

b) Electrodo de grafito.

Entre las ventajas que tiene sobre el electrodo de platino, pueden nombrarse su bajo costo y disponibilidad (Jenking y Kawamura 1971 ref.17). Este material prometía mucho, pues al contrario del platino, su sensibilidad se incrementa con el uso, hasta estabilizarse en un valor alto. Estos resultados fueron opacados cuando al ser montada una membrana enzimática en el electrodo, paulatinamente iba perdiendo sensibilidad tanto al peróxido como a la glucosa. Esta pérdida de sensibilidad es posiblemente debida al ácido glucónico generado, pues el pH afecta en gran medida el tiempo de recuperación del electrodo. Debido a lo anterior, no se usó el grafito como electrodo de trabajo.

c) Oro por depósito electrolítico.

Como la reacción del electrodo es superficial y debido al costo del oro, se intentó el depósito de oro electrolíticamente, para usar esta superficie como electrodo.

Dicho depósito se llevó a cabo utilizando la pieza a dorar como cátodo y aplicando una diferencia de potencial de 3V, respecto a un electrodo de referencia de acero

inoxidable, en una solución cuya composición es:

Cianuro de oro y potasio	3 gr/l
Cianuro de potasio	3 gr/l
Carbonato de potasio	3 gr/l

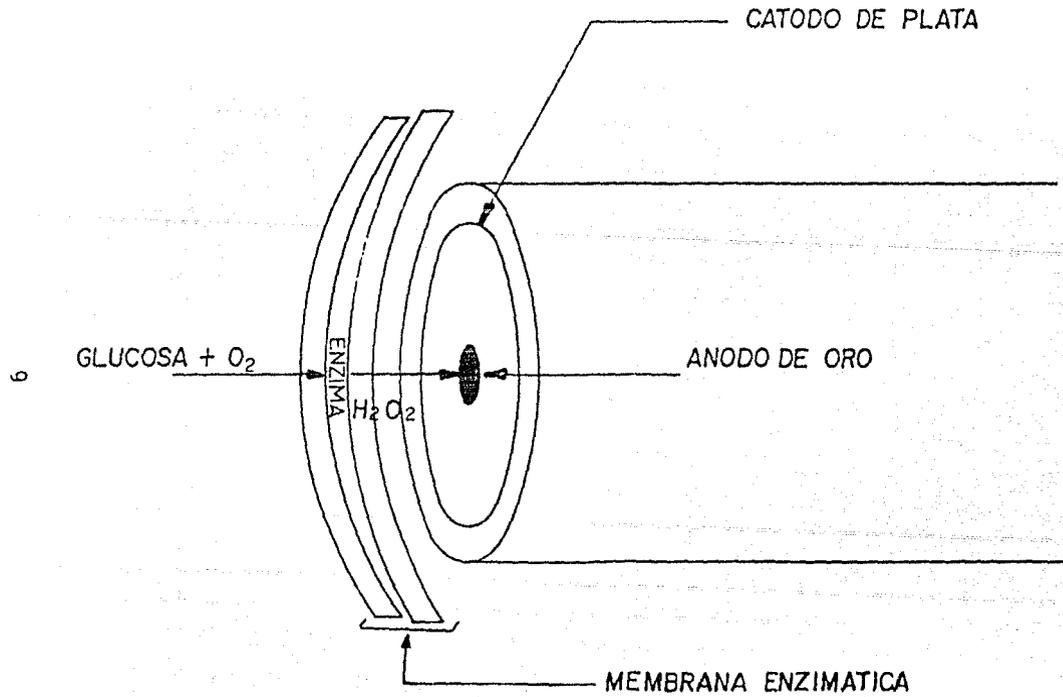
Con este electrodo se encontraron buenos resultados y sensibilidad, pero debido a pequeños defectos en el depósito de oro, después de algunos días podía observarse corrosión sobre el ánodo y debido a la migración de algunos iones, una coloración negra en la plata. Por esto y debido a que el oro empleado en el electrodo contribuye en poco al costo total, se empezó a trabajar con oro de 24 K.

d) Electrodo de oro.

En función de la estabilidad observada en la medición, su alta sensibilidad, comparable con la del grafito y de ser de fácil obtención en el país, el electrodo de trabajo de oro, fué la solución buscada en el detector de peróxido de hidrógeno.

1.5 Principio de medición para glucosa.

La glucosa inyectada en la cámara de medición, una vez diluida, empieza a difundirse a través de una membrana hasta encontrarse con la enzima (ver figura 1.1.).



Principio funcional de la medición de Glucosa.

Fig. 1.1

Esta enzima, que se encuentra confinada entre dos membranas, oxida la molécula de glucosa según la ecuación 1.1 y genera una molécula de peróxido de hidrógeno por cada molécula de glucosa que reaccione (ver fig. 1.1). El peróxido de hidrógeno resultado de esta reacción, empieza a difundirse al igual que la glucosa hasta encontrarse con el detector de peróxido de hidrógeno, en donde es disociado, entregando la carga equivalente a dos electrones por cada molécula de peróxido que reaccione en él.

Como consecuencia de este proceso, en la parte lineal de medición (ver linealidad a la medición de glucosa pag.89), la respuesta del electrodo a un tiempo constante después de la inyección (ver fig.4.6 pag.95), es función directa de la concentración de glucosa en la cámara de medición. Sabiendo esto, basta con inyectar una muestra con concentración conocida de glucosa en el intervalo lineal, para poder evaluar la constante de proporcionalidad y hacer posible el determinar una concentración problema o desconocida de glucosa.

1.6 Partes del sistema de medición.

Para la medición de glucosa por el electrodo enzimático, es necesario el uso de una serie de elementos, entre los que se encuentran la cámara de dilución y mezclado, jeringa para suministro de muestra, sistemas de control de las variables (temperatura, pH, agitación), medición y procesamiento de la señal, además del detector de peróxido de hidrógeno y

membrana enzimática, que forman al electrodo enzimático. Estas partes serán descritas a continuación.

1.6.1 Cámara de dilución y mezclado.

Debido a la baja solubilidad de oxígeno en el agua y a que éste ocupa un importante papel en la actividad enzimática (ver ecuación 1.1), para seguir teniendo linealidad en la medición de altas concentraciones de glucosa, es necesaria la dilución de la muestra. Este proceso en operaciones manuales, implica un gran riesgo de error, además de ser una operación tediosa.

La cámara de dilución, fué construida en una pieza de acrílico (por ser transparente facilitando la supervisión del proceso) y consiste en una cavidad de aproximadamente 1cm^3 ; a la cual puede ser introducido el electrodo enzimático y un par de pequeños conductos para el lavado de la muestra anterior (ver fig.1.2). De esta forma con la simple inyección de la muestra a la cámara, es desplazada parte de la solución amortiguadora de pH (con la que está llena inicialmente la cámara), obteniéndose una dilución precisa y sencilla de realizar.

Para el mezclado y homogenización de la muestra en la cámara de medición, tiene un pequeño agitador magnético, que en su parte superior lleva una paleta. Este agitador es impulsado por cuatro electroimanes, manejados de forma tal, que hacen rotar el campo magnético en la zona en que se encuentra el agitador, arrastrándolo.

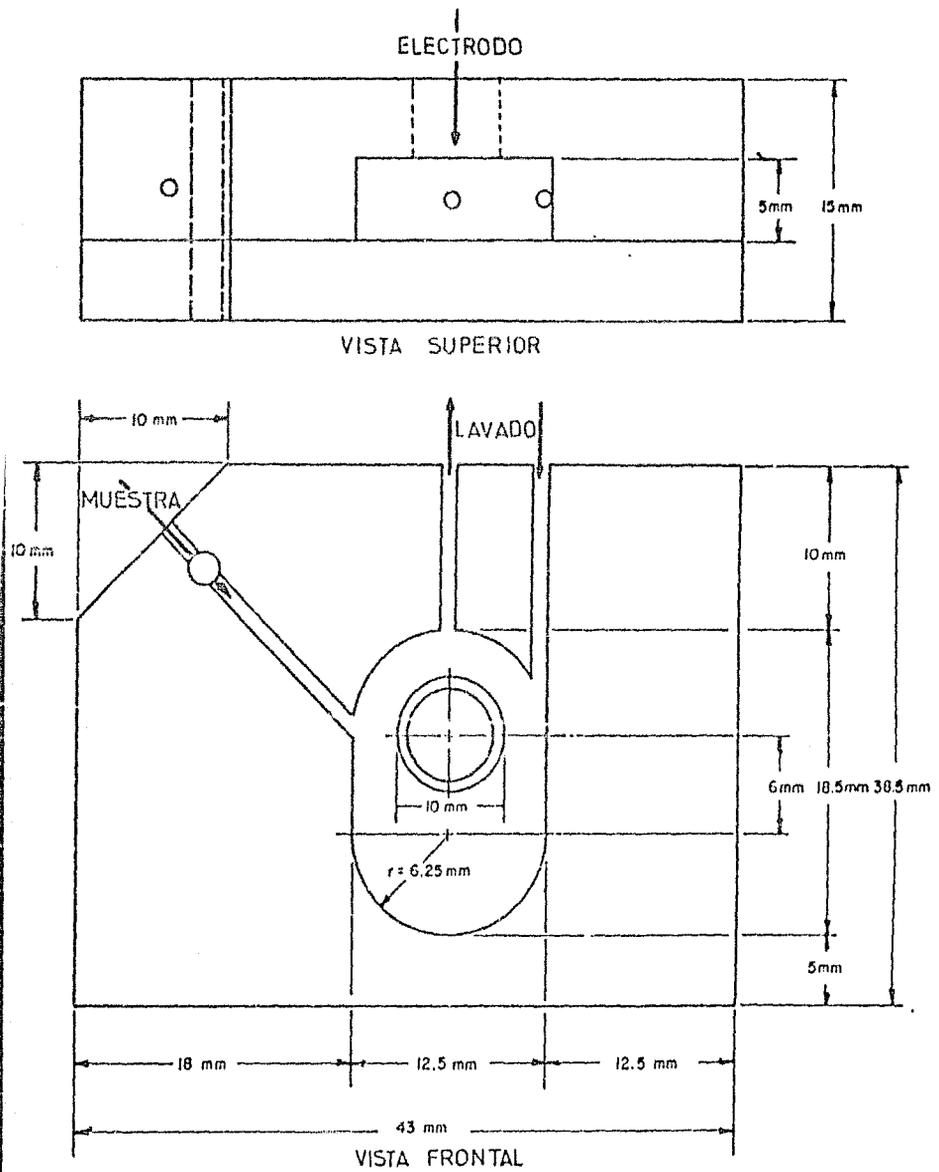


Fig. 12 CAMARA DE MEDICION

Este método hace que la impulsión pueda ser hecha a través del acrílico, sin que sea necesaria una unión mecánica entre el agitador y el "motor", que con el desgaste facilitaría la fuga de líquidos y la entrada de ruido al sistema de medición.

1.6.2 Detector de peróxido de hidrógeno.

El detector de peróxido final, quedó como una pequeña barra de acrílico, en cuyo extremo están expuestos los electrodos de trabajo y referencia; el segundo construido de plata en forma de anillo y al centro el electrodo de oro o de trabajo. Este electrodo de oro tiene forma de "casquillo", para poderlo conectar térmicamente a una barra de cobre, a la cual se le controla la temperatura a 37° grados centígrados. Temperatura óptima para el funcionamiento de la enzima (Cass y Davis 1984 ref.11). Controlar la temperatura es importante, debido a que la constante de disociación de los iones que intervienen en la reacción depende de la temperatura y el controlarla en la superficie del electrodo garantiza un control óptimo (ver fig. 1.3).

1.6.3 Membrana enzimática.

La membrana enzimática consiste en dos membranas permeables a la glucosa, que tienen por funciones el dar un soporte mecánico a la enzima atrapada entre ellas, impidiendo que se pierda en el proceso de lavado de la muestra y fuerza a que el proceso sea controlado básicamente por difusión.

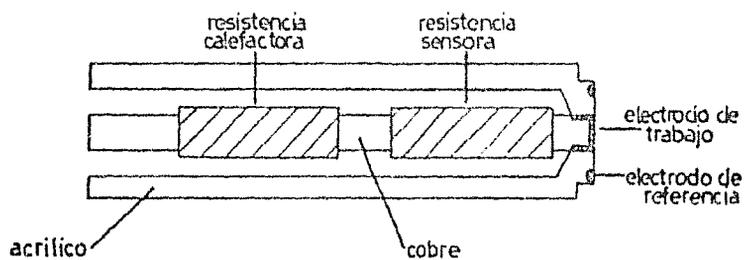


FIG. 1.3 DETECTOR DE PEROXIDO

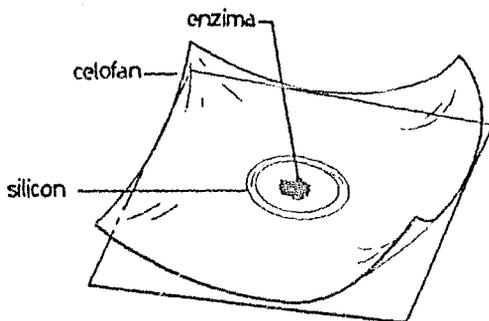


FIG. 1.4 MEMBRANA ENZIMATICA

Existen dos métodos para el atrapamiento de la enzima, el químico y el físico. Estos métodos serán expuestos a continuación.

a) Atrapamiento químico.

El proceso de inmovilización químico a la membrana, consiste en el enlace covalente de la enzima con la membrana. Este enlace se lleva a cabo con el uso del reactivo bifuncional "GLUTARALDEHIDO" (Mascini y Guilbault 1986 ref.14), que tiene la propiedad de tener grupos reactivos que permiten fijar la enzima a la membrana. Es importante en este proceso de inmovilización, el evitar al máximo que la enzima no sea enlazada por su centro activo (ver actividad de la enzima), pues de lo contrario quedaría inactiva. Lo anterior puede llevarse a cabo agregando glucosa a la enzima a enlazar, para tener bloqueada la zona activa de la enzima y con ello hacer menos probable su enlace inadecuado.

El tener inmovilizada la enzima, tiene por ventajas el que es menos inestable a la temperatura además de ser necesaria sólo una membrana, pero tiene por desventaja que es muy poca la cantidad de enzima inmovilizada en relación al método de atrapamiento físico.

b) Atrapamiento físico.

El método de atrapamiento físico fué el primero utilizado en un electrodo enzimático (Clark 1962 ref.28), y consiste en el confinamiento de la enzima, debido al tamaño del poro de la membrana, pero que debe permitir a la vez, el

pase de las sustancias a medir. Lo anterior se consigue con relativa facilidad, debido al gran tamaño de las enzimas.

En este electrodo, fué utilizado el método de atrapamiento físico, debido a su fácil reproducción, además de haber obtenido una estabilidad operacional aceptable (1% en 100 análisis). Esta membrana está hecha con un par de hojas de celofán, entre las cuales se coloca la enzima y se pegan por un círculo de silicón, que además impide que la enzima se desplace fuera del área que ocupa el detector de peróxido (ver fig. 1.4). Esta membrana es puesta sobre el detector de peróxido e introducida a la cámara de medición, quedando después de unos minutos lista para la medición.

1.6.4 Electrónica implementada.

Como era de esperar, la electrónica a desarrollar debía de satisfacer las necesidades de control de las variables que afectan a la medición, además de poder procesar la señal generada por el electrodo. Para lograr esto, fueron diseñados y construidos los sistemas indicados en la figura 1.5, que a continuación serán descritos.

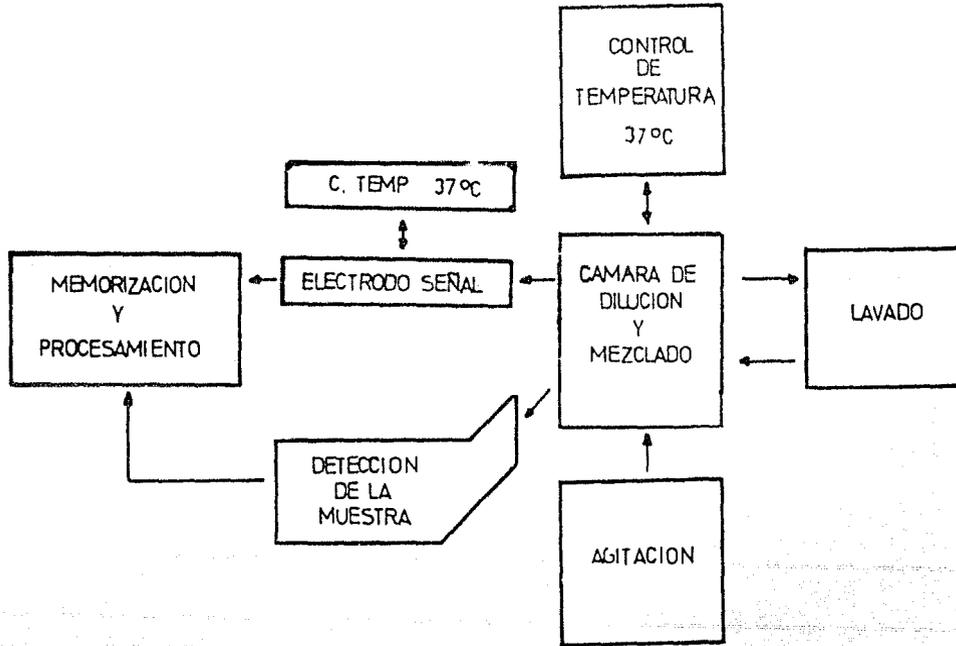


fig. 1.5 DIAGRAMA DE MEDICION Y CONTROL

PROCESAMIENTO Y MEMORIZACION

a) Convertidor de corriente a voltaje.

Para facilitar el manejo de la señal entregada por el detector de peróxido, que es una corriente eléctrica proporcional a la concentración de peróxido en su superficie (en la parte lineal), fué necesaria su transformación a voltaje para su futuro procesamiento y despliegue.

El convertidor de corriente a voltaje, está formado por un amplificador operacional como el mostrado en la fig 1.6 y cuya respuesta está dada por:

$$I = -V_o/R \dots 1.4$$

en donde V_o es la salida de voltaje del amplificador, R la resistencia de retroalimentación e I la corriente entregada por el electrodo. De esta forma el voltaje entregado por el amplificador operacional, es proporcional a la corriente entregada por el electrodo; pudiendo cambiar el factor de amplificación, con el valor de la resistencia R (el valor final empleado es de $1E7$ OHM).

b) Memorización.

La información de la concentración de glucosa en la cámara de dilución, está incluida tanto en el valor de la situación estacionaria como en la pendiente de la respuesta del electrodo a un tiempo dado (esto fuera de la limitación

de oxígeno ver fig.4.5 pag.93). Más debido a que en los primeros momentos de la reacción la limitación de oxígeno es menos problemática, la lectura es tomada en la pendiente de la curva de respuesta, memorizando a dos tiempos la señal del electrodo. Esta memorización es llevada a cabo analógicamente, con la carga al voltaje de muestreo de un condensador cerámico y su lectura con un amplificador operacional de entrada a FET. De esta forma, debido a la baja demanda de corriente del amplificador operacional, es posible leer y conservar la lectura por el tiempo suficiente para ser procesada. El circuito empleado para la carga y lectura de la memoria, está mostrado en la figura 1.7.

La primera memorización tiene por objeto el eliminar la lectura inicial del electrodo, producida por residuos de la muestra anterior, así como por la presencia de peróxido de hidrógeno en la misma agua y la corriente debida a la posible electrolisis del agua. La segunda memorización es tomada un tiempo (T_M) después de ser detectada la inyección de la muestra, y es la encargada de incorporar a la lectura los cambios provocados por la reacción de la glucosa.

El determinar el valor de T_M , impone un compromiso entre la relación señal ruido, que se mejora al ampliar el intervalo de tiempo, y la reducción del intervalo lineal debida a la limitación por oxígeno con el incremento del tiempo T_M (ver fig.4.6 pag.94). Este compromiso queda resuelto, en el momento que es designado el rango de medición de interés (En el caso de medición de glucosa en

sangre entre 70 y 400 mgr/dl; quedando entonces designada la relación señal ruido más alta posible.

c) Procesamiento.

Una vez obtenidos los dos registros en las memorias, es necesario su procesamiento para desplegar la lectura en miligramos por decilitro (mg/dl). Para lograr lo anterior, se emplea un amplificador operacional, que realiza la diferencia entre las lecturas registradas en las memorias; seguido de otro amplificador operacional, encargado de ajustar la "ganancia" del circuito y el valor de la medición cuando es inyectada una muestra con concentración de 0 mg/dl "cero". Con esto es posible calibrar la electrónica, ajustando el control de "cero" con la inyección de una concentración de agua destilada, y luego la ganancia con la inyección de una muestra con concentración conocida de glucosa. Después de lo anterior, el sistema queda listo para la determinación de una solución problema. El circuito empleado para el procesamiento de la señal, se muestra en la figura 1.8.

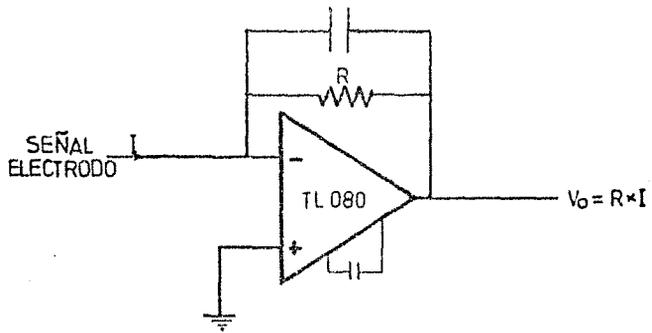


FIG. 1.6 CONVERTIDOR DE CORRIENTE A VOLTAJE

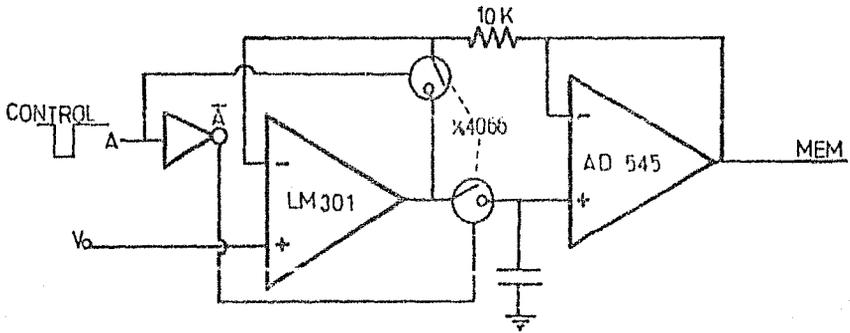


FIG. 1.7 MEMORIZACION

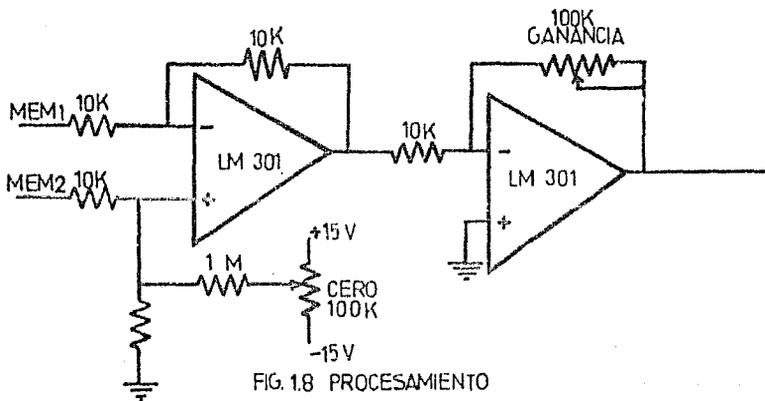


FIG. 1.8 PROCESAMIENTO

CONTROL

d) Control de Temperatura.

La temperatura y el pH son las condiciones que más influyen en la respuesta del electrodo. Debido a esto, fué necesario el incluir dos medidores y controladores de temperatura; uno en el electrodo, para garantizar el control de la temperatura en la superficie de reacción del electrodo y otro en la cámara de medición, para facilitar el aumento de la temperatura desde la ambiente hasta la temperatura de óptima operación 37 C. El tiempo de respuesta a la temperatura hasta los 37 C es de 5 seg. al 90% y el circuito empleado para su determinación se encuentra mostrado en la figura 1.9.

e) Agitación.

Para facilitar el mezclado de la muestra a medir, además de mejorar el intercambio de calor en el calefactor de la cámara de medición, fué incluido un agitador magnético, el cual es impulsado por cuatro electroimanes manejados de forma tal, que hacen girar el campo magnético en la zona del agitador, arrastrándolo. El circuito empleado para este fin, se encuentra esquematizado en la figura 1.10.

MEDIDOR Y CONTROLADOR DE TEMPERATURA

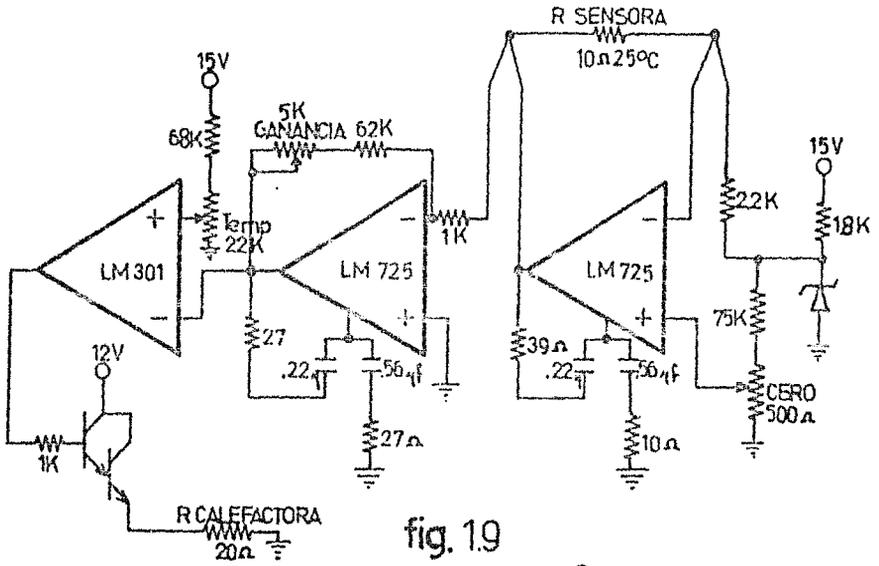
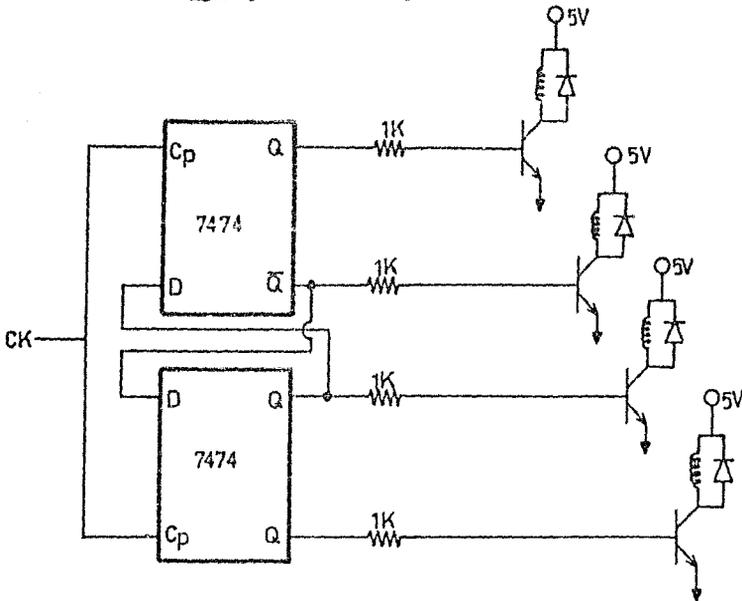


fig. 19



SISTEMA DE AGITACION

fig. 110

f) Lavado.

Una vez realizada una determinación de glucosa, es necesario el limpiar la cámara de medición, dejandola lista para una nueva determinación. Para esto, es inyectado por una bomba eléctrica el amortiguador de pH, que desplaza la muestra anterior y hace estable el pH en la cámara de medición. La estabilidad del pH es importante, para eliminar alteraciones por el ácido gluconico generado por la enzima, además de variaciones de acidez o alcalinidad en la muestra inyectada.

Para terminar con lo referente a la parte electrónica desarrollada, en la figura 1.11 son mostradas las fuentes de alimentación, utilizadas en la medición y control del electrodo enzimático.

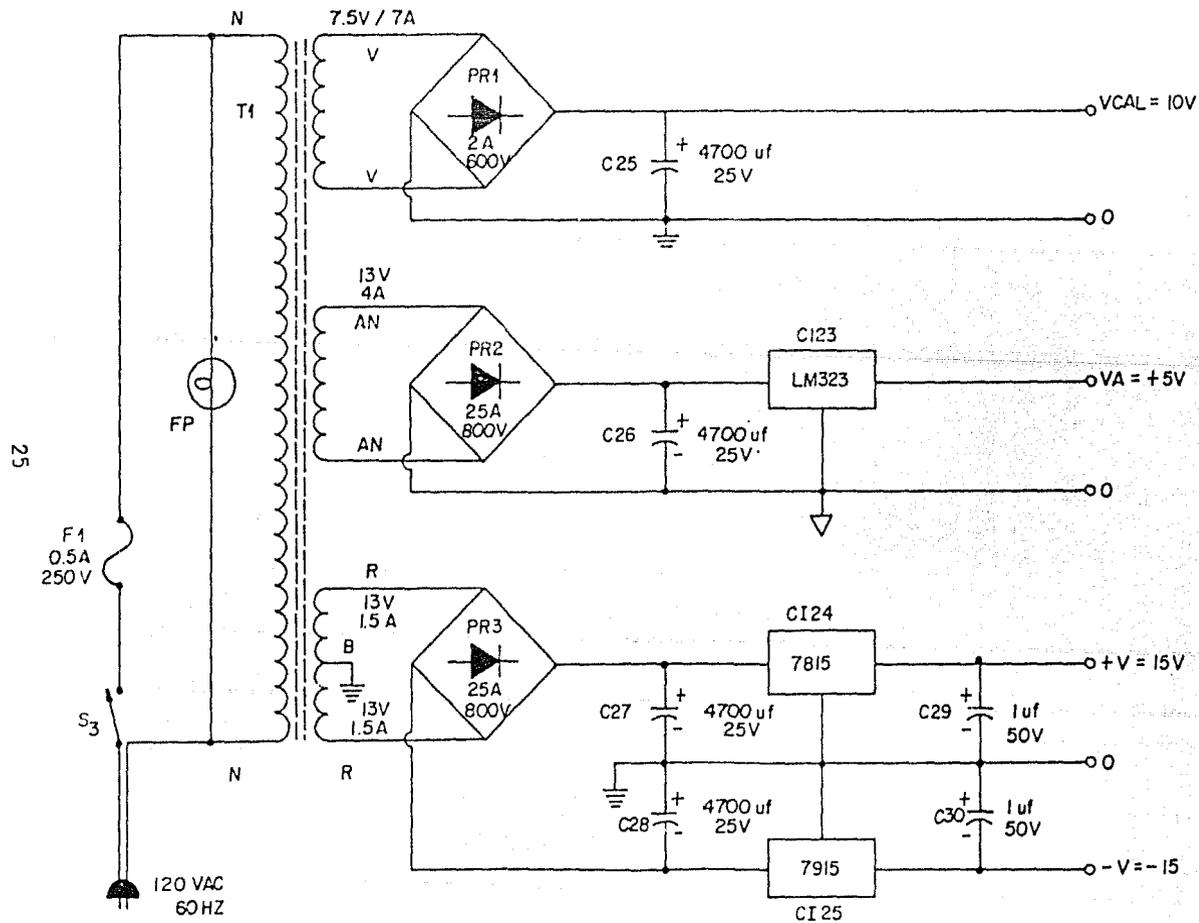


Fig.11: FUENTES DE PODER

CAPITULO 2

VARIABLES IMPORTANTES EN LA OBTENCION DE LA SEÑAL

RESUMEN

Debido a que la respuesta del electrodo enzimático es afectado por cambios en el medio ambiente además de la presencia de ciertos iones y sustancias, es importante determinar cuales son las causas más importantes que la alteran. Lo anterior es con el fin de poder controlar estas variables, haciendo que sus influencias sean mínimas.

En el presente capítulo serán expuestas las principales causas que la literatura señala como fuertes causantes de alterar la respuesta del electrodo (temperatura, voltaje de polarización, Ph, agitación, oxígeno disuelto, enzima activa), con el fin de seleccionar los valores más adecuados y hacer su respuesta más reproducible.

2.1 Dependencia con la temperatura.

La temperatura, es uno de los factores más importantes en la estabilidad operacional del electrodo enzimático. Esto es debido a que influye tanto en la constante de disociación del peróxido de hidrógeno, como en la velocidad promedio de reacción de la enzima, a la que llamaremos actividad enzimática. Lo último es importante, porque la actividad enzimática determina que el proceso esté controlado por difusión o reacción, y por tanto influye en la linealidad de la respuesta.

2.1.1 Efecto en la actividad y estabilidad de la enzima

Generalmente, las reacciones químicas presentan un incremento en la velocidad de reacción con el aumento de la temperatura. Esto es debido a que el incremento en la temperatura fuerza el aumento de la velocidad promedio de las moléculas, aumentando la probabilidad de colisión y reacción. Las enzimas, que son moléculas proteínicas complejas, no escapan a este comportamiento en un intervalo de temperatura.

En las enzimas, no toda su estructura es capaz de tener un efecto catalítico (ref.13 Cap.1.24); la zona activa de la enzima se encuentra en una región llamada "Centro Catalítico", en la que debido a la interacción del resto de la enzima (como una llave), es posible la catálisis. Por lo antes mencionado, la temperatura juega un importante papel en la actividad enzimática, pues provoca perturbaciones en

la estructura de la enzima, que pueden alterar su efecto catalítico, e incluso puede provocar su degradación por ruptura. Esto hace considerar a las enzimas como estructuras funcionalmente frágiles, siéndolo más entre mayor peso molecular tengan (ref.16).

Los efectos antes mencionados, por un lado el incremento de la probabilidad de reacción con el aumento de la temperatura y por el otro lado, la pérdida de la actividad enzimática por perturbación o ruptura térmica, llevan a la existencia de una temperatura óptima de operación. Esta es la temperatura en la cual se tiene la actividad enzimática máxima, con una buena estabilidad operacional en el tiempo (poca pérdida de sensibilidad). Esta temperatura óptima es fácilmente establecida probando a diferentes temperaturas la actividad de la enzima y observando la temperatura en la que se obtenga un máximo de sensibilidad. En la evaluación de esta temperatura para el electrodo, se integró la variación de la constante de disociación con la actividad enzimática, resultando óptima en una temperatura de 37° grados centígrados a pH=7 (ver fig. 2.1).

La estabilidad de la enzima a la temperatura, es afectada entre otros factores por el pH y fuerzas iónicas, efectos que pueden ser usados para disminuir su degradación por temperatura (ref. 16).

Analíticamente, sin considerar la degradación térmica de las enzimas, la relación entre la actividad enzimática (K) y la temperatura, esta descrita por la ecuación de Arrhenius

$$K=A*\exp(-Ea/RT) \dots\dots 2.1$$

en donde A es una constante de la reacción particular, Ea la energía de activación, R la constante de Rydberg y T la temperatura en grados Kelvin. En la figura 2.2, se muestra una gráfica de 1/T contra el logaritmo de la actividad. Como puede observarse en la gráfica, esta representación puede considerarse como una buena aproximación a la curva experimental, cuando se manejan temperaturas inferiores a la temperatura óptima.

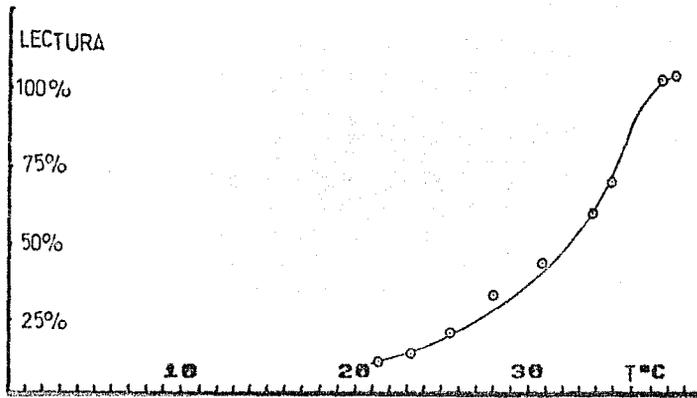


fig. 2.1 RESPUESTA A LA TEMPERATURA

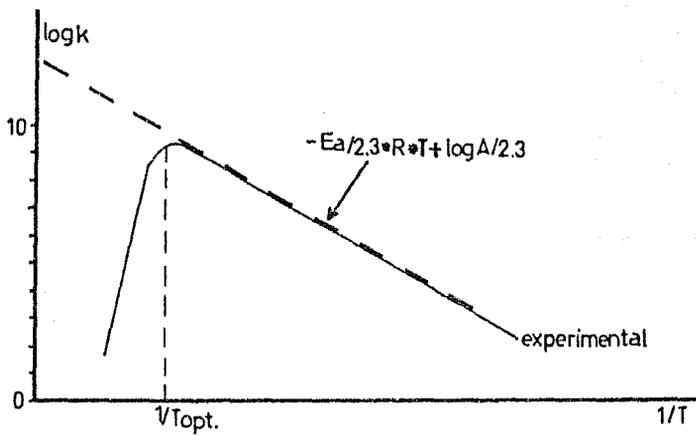
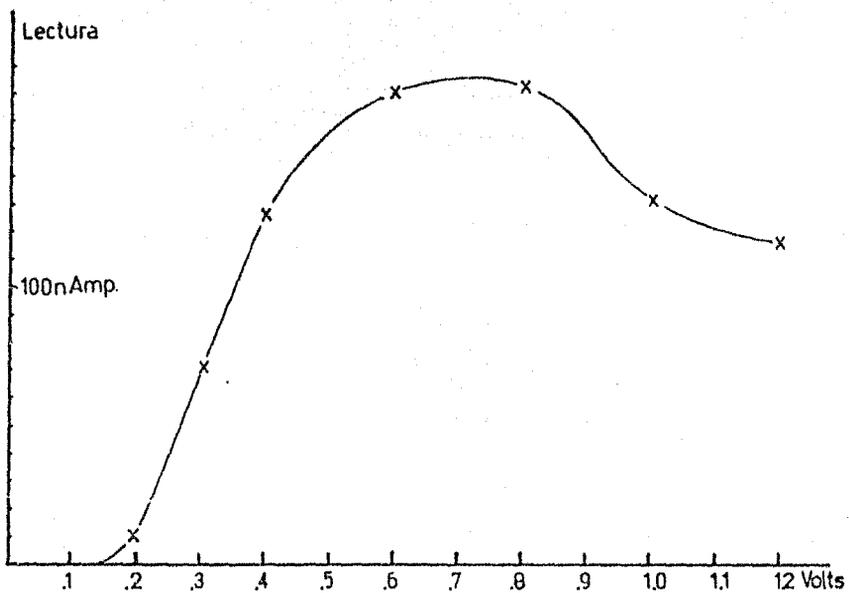


fig. 2.2 ENERGIA DE ACTIVACION

2.2 Dependencia con el voltaje de polarización.

Como se mencionó en el capítulo 1, el detector de peróxido de hidrógeno consiste en un par de metales, uno de referencia de plata y otro de trabajo de oro; los cuales están sometidos a una diferencia de potencial, debida a una fuente de voltaje externa. Cuando se establece un circuito cerrado entre el sistema de electrodos, puede medirse corriente debido a la presencia de dos efectos; uno de ellos, el reacomodo de carga por polarización de la solución, sin que se lleve a cabo ninguna reacción entre los electrodos y la solución (caso similar a la carga almacenada en un condensador polarizado adecuadamente PROCESO FARADICO) y el otro caso, debido al transporte de iones a través de la solución y su reacción en los electrodos (efecto por el que es medido el peróxido de hidrógeno o PROCESO NO FARADICO). Por lo anterior, una variación en el voltaje de polarización es importante, porque altera el potencial eléctrico externo que fuerza el desplazamiento de los iones hacia los electrodos (con la consecuente variación de la actividad del detector de peróxido); además de que al tender a alcanzar el equilibrio, la carga superficial en los metales (debido a efectos de polarización) es redistribuida, generando corrientes aún sin la presencia de peróxido de hidrógeno (fácilmente puede saturarse por este medio el sistema de medición). Es por esto que debe ponerse especial cuidado en la estabilidad del voltaje de polarización, pues puede causar variaciones en la actividad del detector de

peróxido de hidrógeno y ruido en la señal entregada. Para hacer el detector de peróxido de hidrógeno lo más inmune posible a cambios de voltaje, el voltaje aplicado en los electrodos debe ser tal, que minimice las variaciones de actividad con el voltaje; además de que dé al electrodo una actividad aceptable y haga difícil la descomposición de otras moléculas (electrólisis del agua aprox. 2V). En la optimización de este voltaje fué evaluada la respuesta del electrodo a la glucosa, con la aplicación de diferentes voltajes de polarización; seleccionando luego el voltaje en el que la lectura fuera más estable (ver fig. 2.3). En esta curva puede observarse el incremento de actividad esperado por el aumento de voltaje de polarización y luego una disminución posiblemente causada por un efecto de apantallamiento en la superficie de los metales, debido a la polarización de las moléculas de agua. Del máximo de esta curva fué obtenido el voltaje de polarización más adecuado para electrodos de oro y de plata, que resultó ser de .7 V a pH 7 y 37°C.



VARIACION DE LA LECTURA
CON EL
VOLTAJE DE POLARIZACION

fig. 2.3

2.3 Dependencia del pH en la respuesta.

El pH se encuentra junto con la temperatura, entre las variables que más afectan la respuesta del electrodo. Esto es debido a que al igual que la temperatura, afecta tanto la actividad de la enzima (Cass y Davis 1984 ref.11), como la del detector de peróxido de hidrógeno (Hickling y Wilson 1951 ref.12), alterando su respuesta al voltaje de polarización en el electrodo.

Estudios realizados por Mascini y Liberti (1974) (ref.14), indican que el pH óptimo para la operación de la Glucosa Oxidasa es 7.0; reduciéndose la actividad de la enzima al aumentar o disminuir el pH.

En el caso de medición de glucosa en soluciones especiales, en las que se requiera una limpieza y desinfección alta, puede ser necesario el uso de soluciones ácidas o alcalinas que ayuden a una mejor limpieza de la cámara de medición (Russell y Rawson 1984 ref.15). Esto hace necesario al igual que en el caso de la temperatura, el determinar el pH más adecuado. El valor óptimo de pH en este caso, será con el que se tenga aún una sensibilidad buena y resultados de limpieza adecuados. En las mediciones realizadas en el hospital A.B.C. en determinaciones de glucosa en suero, plasma y sangre completa, no se tuvo la necesidad de cambiar el pH de 7; teniendo cuidado de lavar "suficientemente" la cámara de medición (ver Cap.4 pag.95).

Para el control de pH, se emplea una solución amortiguadora de fosfatos pH 7. Esta solución amortiguadora,

como su nombre lo indica, no elimina la posibilidad de cambios de pH debidos a la inyección de la muestra, pero hace que estas variaciones sean menos notorias, en comparación a los cambios obtenidos, si por ejemplo, fuera agua destilada simple el líquido con el que se lavara la cámara de medición.

2.4 Agitación.

Para aumentar la reproducibilidad en la medición, es necesario que las condiciones iniciales, así como las condiciones durante el proceso, sean mantenidas lo más fielmente posible. En lo anterior, la agitación en la cámara de medición juega un importante papel; ya que homogeneiza la muestra inyectada, garantizando una buena dilución, además de mejorar el intercambio de calor entre el líquido de la cámara y el sistema de calefacción (ver electrónica desarrollada Cap. 1).

El agitador, consiste en un pequeño imán unido a una paleta de plástico, y se encuentra en el interior de la cámara de dilución. Este es impulsado magnéticamente por cuatro electroimanes, a través del acrílico de la cámara de medición (ver Agitación pag. 22).

Este método tiene por principal ventaja, el que no sea necesario el tener una unión mecánica al interior de la cámara, que causaría problemas de fugas con el desgaste y entrada de ruido al sistema de medición.

2.5 Limitantes a la linealidad.

2.5.1 Cantidad de enzima activa.

Esta variable es la principal causante de la no linealidad del electrodo a las concentraciones de glucosa manejadas (0-400 mg/dl), pues provoca que el proceso en el electrodo no esté fundamentalmente controlado por difusión, sino también por reacción, imponiendo limitaciones debidas a las concentraciones de los reactivos, así como las velocidades de reacción.

La baja cantidad de enzima activa causante de la no linealidad, pueda ser temporal como en el caso de baja temperatura de operación o limitación de oxígeno disuelto (ver respuesta a la temperatura), o también puede ser permanente como en el caso de poca enzima en la membrana, degradación con la temperatura o envenenamiento de la enzima (ref.13 Cap.1.32).

Con el objeto de reducir la influencia de la actividad enzimática, a continuación se darán algunas recomendaciones pertinentes, para el manejo y preparación del electrodo enzimático.

a) Para eliminar la posibilidad de baja actividad transitoria por temperatura, ésta debe ser de 37°C, con lo que se obtiene un máximo de actividad de la enzima y una baja degradación por temperatura.

b) Para reducir la limitación por oxígeno disuelto, la muestra inyectada es pequeña (50ul) y el análisis de la

muestra es realizado en los momentos iniciales del proceso de difusión, reduciendo los problemas por limitación de oxígeno.

c) Para evitar que la cantidad de enzima inicial en la membrana sea un problema, es puesta en ella un exceso de enzima (aprox. 1mg/l).

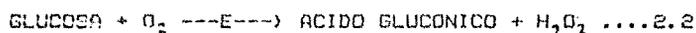
d) La presencia de algunas sustancias pueden reducir la actividad enzimática. Este principio es usado por los organismos como un mecanismo de regulación de las actividades enzimáticas e incluso algunas son capaces de modificar su selectividad, alterando la estructura del centro activo (Modificadores Alostericos). Algunos metales como el arsénico o el mercurio, provocan el bloqueo del centro activo, impidiendo su acción catalítica. A estas sustancias suele llamarseles "venenos de enzimas" y para evitar este problema, se debe tener cuidado en la pureza de los componentes del amortiguador de pH.

2.5.2 Oxígeno disuelto.

En temperatura normal de operación, el oxígeno disuelto es la principal causa de baja cantidad de enzima activa y debido a la baja solubilidad del oxígeno en agua (aprox $3E-7$ mol/cm³ a temp. ambiente), ésta es una gran limitante del intervalo lineal. Por esto es necesario el hacer dilución en la muestra, para incrementar el intervalo lineal de medición.

La enzima potencialmente activa, es decir la que puede

reaccionar y no ha sufrido degradación térmica puede encontrarse en dos estados, uno de oxidación (propriadamente activa) y otro en estado reducido (inactivo latente). Cuando la enzima se encuentra en estado oxidado, puede ceder energía para lograr la oxidación de la molécula de glucosa y la formación de peróxido de hidrógeno. Después de esto, la enzima queda en estado de baja energía o inactivo latente, sin poder reaccionar más con la glucosa. Más la enzima puede recuperarse y pasar nuevamente a un estado de oxidación y actividad, tomando de la temperatura del medio, la energía suficiente para que el agente oxidante (O₂ en este caso, Anthony F.G. Cass, Graham Davis 1984 ref.11) pueda interactuar con la enzima (ver dependencia con la temperatura) y hacerla pasar nuevamente a un estado activo.



Según la ecuación 2.2, de existir una cantidad inagotable de oxidante, no existiría problema debido a la disponibilidad de enzima activa; quedando el proceso controlado solamente por difusión y consecuentemente lineal (esto fuera del intervalo en que la velocidad de reacción de la enzima pudiera afectar, aproximadamente tres órdenes de magnitud por encima de las concentraciones manejadas). Más debido a la baja solubilidad de oxígeno en agua, con el tiempo, la cantidad de enzima activa disminuye quedando el sistema no solamente controlado por difusión, sino también

por reacción; haciendo el proceso no lineal. Esta es la razón, por la que la lectura del electrodo se toma en los momentos iniciales después de la inyección de la muestra, disminuyendo con esto la limitación de oxígeno además de ampliar el intervalo lineal del electrodo enzimático (ver fig.4.6 pag.95).

CAPITULO 3

MODELO PARA LA SIMULACION DE UN ELECTRODO ENZIMATICO PARA GLUCOSA

RESUMEN

En este capítulo será mostrado el desarrollo de un modelo para la simulación del proceso llevado a cabo en el electrodo enzimático, cuyo desarrollo fue realizado en tres partes: la primera encargada de representar la difusión de una especie a través de una membrana desde la cámara de medición y su detección en el electrodo; como sería el caso de una inyección de peróxido en la cámara de medición y su detección en el electrodo. La segunda, encargada de representar el proceso de medición de glucosa, sin ninguna limitación que no sea el transporte debido a la difusión para cada una de las especies glucosa y peróxido. En la tercera parte, es contemplada la posibilidad de pérdida de actividad en la enzima, debido a la limitación de oxígeno disuelto. Los resultados de la simulación de este modelo, predicen la pérdida de linealidad observada experimentalmente y también el que el electrodo tenga un tiempo de respuesta para glucosa más pequeño que para peróxido.

Como resultado de la comparación de la simulación del modelo con la respuesta del electrodo, puede decirse en general, que el comportamiento predicho en la simulación es bastante cercano a la respuesta experimental del electrodo.

3.1 Hipótesis para la formulación del modelo

La formulación de un modelo es de suma importancia, pues con él es posible verificar la factibilidad de la ocurrencia de un proceso, además de facilitar la manipulación de las variables que intervienen en él. Esta manipulación adquiere gran importancia cuando se busca la optimización del sistema.

El modelo sugerido, está descrito esencialmente por el "principio de funcionamiento" expuesto en el Cap. I; y las hipótesis utilizadas para su formulación son las siguientes:

I) En el intervalo de concentraciones de glucosa en el que el electrodo responde linealmente, el proceso está controlado esencialmente por difusión. Lo anterior quiere decir, que en este intervalo no existe ninguna limitación para la detección de glucosa, que no sea el proceso de transporte debido a la difusión por las membranas. Esta hipótesis puede considerarse como una buena aproximación en los primeros instantes del proceso de medición.

II) Que la limitación a la linealidad observada experimentalmente, es debida al decremento del oxígeno disuelto, o a la saturación de la actividad enzimática provocada por el incremento en la concentración de glucosa, descrita por la ecuación de Michaelis (ec. 3.18 pag. 73). Esto quiere decir, que las únicas causas que pueden provocar la pérdida de linealidad, son la falta de oxígeno disuelto en la zona de reacción o la saturación de la actividad enzimática, debida al tiempo de interacción entre la enzima

y la glucosa (ver limitantes a la linealidad cap. 2). En este caso, el proceso deja de estar controlado solamente por difusión, para ser controlado además por reacción; haciendo que el proceso sea lineal sólo en los primeros momentos del proceso, o en concentraciones bajas en las que es válida la hipótesis I).

Adicionalmente a las hipótesis antes mencionadas, en las partes del desarrollo del modelo a las que se hará referencia más adelante, será necesario el incluir hipótesis de trabajo adicionales, como lo son condiciones iniciales y de frontera, que de alguna forma deberían ser consideradas aquí, sin embargo para facilitar su manejo serán puntualizadas en su momento.

3.2 Partes para el desarrollo del modelo.

El desarrollo del modelo fue planteado en tres partes, en las cuales se fue incorporando la descripción de cada una de las especies que intervienen en la reacción.

1) La primera, encargada de representar la detección de peróxido de hidrógeno. Obteniéndose como resultado, el coeficiente de difusión del peróxido de hidrógeno en la membrana enzimática.

2) En la segunda parte, es adicionada al transporte de peróxido el transporte de glucosa, sin imponer ninguna limitación en la velocidad de reacción promedio de la enzima y se encarga de representar la parte lineal de la respuesta del electrodo en la medición de glucosa. En esta parte, es

tomada la hipótesis I) señalada anteriormente; y debido a que en los primeros instantes del proceso estas consideraciones deben ser compatibles con el proceso real (no debe existir en esos momentos limitación por oxígeno o concentración), esta parte es empleada además en la obtención del coeficiente de difusión para glucosa. Lo anterior es realizado, con el ajuste de la simulación a los resultados experimentales en los primeros momentos del proceso.

3) La tercer parte, la cual complementa a la segunda, considera la posibilidad de pérdida en actividad enzimática debida a la falta de oxígeno disuelto en la zona de reacción, y el efecto de "saturación" provocado por el tiempo de reacción entre la enzima y la glucosa (hipótesis II). Esta hipótesis incluye a la hipótesis I pag.41, mas debido a su empleo en la parte 2 de la simulación, es conveniente el exponerlas por separado.

Para la simulación de cada una de estas partes fueron empleados métodos numéricos, que a continuación serán descritos con más detalle.

3.3 Descripción de la primera parte de simulación.

En esta primera parte de simulación, se pretende describir la respuesta del electrodo enzimático, cuando es inyectada una muestra de peróxido de hidrógeno; además de iniciar la aplicación de los métodos numéricos en este problema simple, para adaptarlo luego a casos más complicados.

El sistema a describir, consiste en una membrana de grosor (U), a través de la cual se difunde el peróxido desde una cámara la cual presenta una concentración inicial C_0 , hasta un electrodo el cual descompone todo el peróxido que a él llega. Esta descomposición de peróxido, es la que da lugar a la respuesta eléctrica del electrodo, según la ecuación 1.2 1.3 del capítulo 1.

3.3.1 Parámetros. Variables de entrada y salida

En esta parte del desarrollo del modelo, los parámetros manejados son:

Número de particiones en la membrana
Área del electrodo .
Grosor de la membrana .
Coeficiente de difusión de peróxido.

Las variables de entrada son:

Concentración de Peróxido

Las variables de salida

Corriente eléctrica simulada del electrodo

3.3.2 Hipótesis para la simulación de la primera parte .

Para su simulación, se plantearon las hipótesis de trabajo siguientes:

a) Todo el peróxido que llega al electrodo es detectado. Esta suposición está fundada en el amplio intervalo lineal del electrodo al medir peróxido, en relación al que en una muestra normal de glucosa será generado, aproximadamente 2 órdenes de magnitud inferior (ver linealidad al peróxido Cap. 4).

b) La reacción en el electrodo es instantánea. Aunque las velocidades de los iones en la solución son pequeñas, (aprox 1×10^{-3} cm/seg ref.1 Cap.21), la respuesta del electrodo a la presencia del peróxido es prácticamente inmediata .

c) El transporte del peróxido a la zona de reacción está controlado por difusión. Esta suposición es adecuada en virtud del poro de la membrana y de que el campo eléctrico usado en el electrodo afecta en poco la velocidad de transporte de los iones (ref.1 Cap.21).

d) El peróxido solamente reacciona en el electrodo. Esta suposición es posiblemente la más débil, debido a que la descomposición del peróxido es una reacción exotérmica espontánea, que puede ser catalizada por la luz y por muchas otras sustancias como el hierro, el cobre y la catalasa (ref 12). En particular ésta última, también una enzima, es desarrollada por los organismos para contrarrestar el efecto tóxico del peróxido de hidrógeno; reduciendo el peróxido en

agua y oxígeno.

Aunque débil, tomémosla como una hipótesis de trabajo.

e) La concentración es uniforme en la cámara de dilución, inmediatamente después de la inyección. Esto es debido a que en la cámara de medición, existe un agitador impulsado magnéticamente que homogeneiza la concentración.

f) El proceso puede ser descrito por difusión en una dimensión. Es razonable por la simetría del sistema, y por la justificación a la hipótesis c).

3.3.3 Simulación por diferencias finitas de la parte 1

El proceso a simular, consiste en la difusión de peróxido de hidrógeno desde la cámara de dilución y mezclado, a través de una membrana de grosor U , hasta encontrarse al otro lado de la membrana con un detector de peróxido (ver figura 3.1). Consideraremos que la concentración inicial de peróxido en la membrana es cero y que después de inyectada la muestra en la cámara, empieza a difundirse hacia la membrana, con una concentración C_0 en la frontera (hipótesis e); además que es posible "partir" la membrana en N partes ($C_1, C_2, \dots, C_n, \dots, C_N$), en las cuales es válido considerar como una buena aproximación, que la concentración promedio de la parte C_n , coincide con la concentración del centro de la parte C_n en la distribución de concentraciones continua (distribución real) (ver fig 3.2). Este es en principio el método de diferencias finitas, mediante el cual es posible el reducir el problema general a

la solución de muchos problemas más simples e iguales; en los cuales son manejadas concentraciones promedio en lugar de la distribución continua de concentraciones del proceso real.

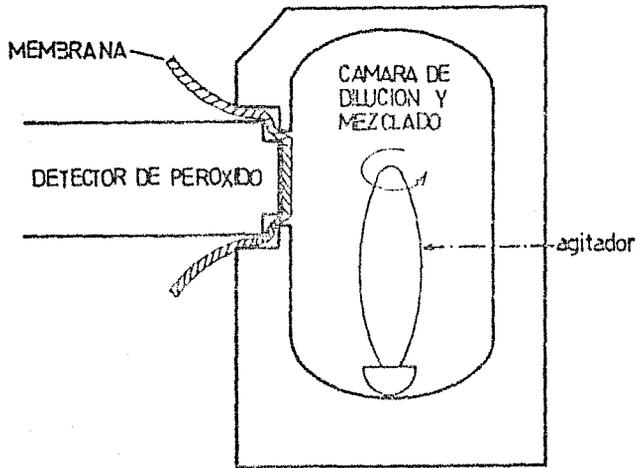


FIG. 3.1 DESCRIPCION DEL SISTEMA

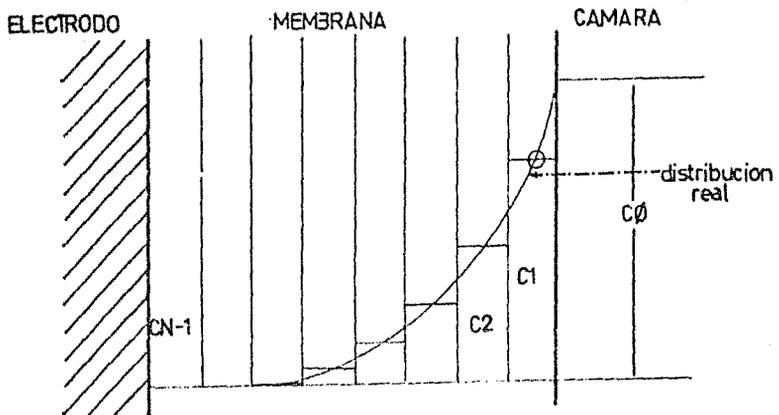


FIG. 3.2 SIMULACION NUMERICA

3.3.4 Obtención de la ecuación de diferencias.

Tomemos como U , el grosor de la membrana y en ella una partición de N con DX el desplazamiento diferencial para cada una de las secciones $DX=U/N-1$.

Debido a las hipótesis c),f), el proceso debe estar descrito por la ecuación de difusión:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \dots 3.1$$

con D el coeficiente de difusión.

Si hacemos una partición de N en la región que corresponde a la membrana, asignando a cada una de las n partes la concentración promedio C_n , la ecuación 3.1 puede escribirse de la forma:

$$(C(n, t+Dt) - C(n, t)) / Dt = -D * (C(n-1) + 2C(n) - C(n+1)) / (DX^2) \dots 3.2$$

en donde el índice representa la posición del segmento (ver fig. 3.2). Despejando la concentración del segmento n al tiempo $t+Dt$, se obtiene la ecuación:

$$C(n, t+Dt) = C(n, t) - D * Dt * (C(n-1, t) - 2 * C(n, t) + C(n+1, t)) / DX^2 \dots 3.3$$

en donde Dt es el incremento en tiempo de cada iteración, D es el coeficiente de difusión de la membrana y $C(n, t)$ la concentración en la sección n al tiempo t . En la ecuación

3.1 se tiene un método recurrente, para calcular la distribución de concentraciones a lo largo de la membrana al tiempo $t+Dt$, sabiendo la distribución de concentraciones al tiempo t . Teniendo las condiciones iniciales en la concentración, es posible entonces describir en el tiempo el comportamiento de las concentraciones a lo largo de la membrana.

En este proceso de simulación, deben ser satisfechas las condiciones de frontera tanto en el electrodo (debiendo ser mantenida cero la concentración en el electrodo $C(N,t)=0$) como en la cámara de medición, partiendo de la concentración inicial C_0 y su continuo ajuste, debido al flujo de peróxido hacia la membrana $C(0,t=0)=C_0$.

3.3.5 Estabilidad del método numérico

Para garantizar la estabilidad del algoritmo, es necesario que:

$$\theta (D \cdot Dt / DX + 2 = \theta < 0.5 \quad \dots 3.4$$

ya que de lo contrario, son provocadas oscilaciones no esperadas en la solución del problema (ref.8).

El valor de θ provoca variaciones en la longitud del incremento Dt en cada "corrida" de la simulación, no alterando significativamente la distribución de concentraciones a un tiempo dado.

Para obtener el valor de la corriente equivalente,

resultado de la simulación, es necesario el determinar el flujo de peróxido en la región cercana al electrodo; para lo cual es necesario el tener la distribución de concentraciones a lo ancho de la membrana, así como el incremento de tiempo entre iteraciones. A continuación será mostrada la obtención de estas cantidades.

3.3.6 Incremento de tiempo entre iteraciones

De la fórmula 3.4 se deduce que el incremento de tiempo entre dos iteraciones del programa de simulación, esta dado por:

$$\Delta t = \theta * DX^2 / D \quad \dots 3.5$$

en donde $\theta \in (0, 0.5)$; DX es el grosor de una partición de la membrana, y D el coeficiente de difusión de la especie a medir (en este caso peróxido).

3.3.7 Lectura en el electrodo

La corriente entregada por la descomposición del peróxido en el electrodo según la hipótesis a), b), si se trabaja con cantidades molares, debe estar dada por (ver descomposición del peróxido Cap.2 y sección 3.3.4)

$$\text{Lectura } n \text{ amp}(t) = 2 * D * A * N_a * e * (1 - E_9) * C(N-1, t) / DX \quad \dots 3.6$$

en donde el 2 es debido al número de electrones generado por

cada molécula de peróxido reaccionando, D el coeficiente de difusión para el peróxido, N el número en la partición, A el área por la que se difunde el peróxido, Na el número de Avogadro por trabajarse en cantidades molares las concentraciones, "e" la carga del electrón y U el grosor de la membrana.

3.3.8 Cambio en la concentración de la cámara de medición

La concentración en la cámara, aunque grande, sufre pérdidas debidas al flujo de peróxido por la membrana. Esto conduce a que la concentración en la cámara de medición, debe ser continuamente corregida cada intervalo Dt, para considerar la posibilidad de manejar coeficientes de difusión más grandes en donde estos cambios son más evidentes.

La pérdida debida al flujo de peróxido a la membrana (considerando las hipótesis c), f), esta dada por:

$$C(0,t+Dt)=C(0,t)-D*A*(C(0,t)-C(1,t))/DX \quad ..3.7$$

donde $C(0,t)$ es la concentración de la región "0", reservada para la cámara de medición, al tiempo t.

Teniendo ya las reglas para la simulación del modelo, generemos el diagrama de flujo para el programa que la maneje.

3.3.9 DESCRIPCIÓN DEL PROGRAMA PARA LA SIMULACIÓN DE UN ELECTRODO PARA PEROXIDO

PASO 1.- Reservar dos regiones de memoria $A(N), B(N)$ para tener la distribución de concentraciones al tiempo t y $t+Dt$ respectivamente.

PASO 2.- Introducir las variables del sistema.

PASO 3.- Inicializar el contador de tiempo CT (El tiempo del proceso estará dado por $CT \cdot Dt$)

PASO 4.- Poner en la región $A(N)$, la distribución inicial de concentraciones.

PASO 5.- Poner en la región $B(N)$ la distribución de concentraciones al tiempo $t \cdot Dt$, según la fórmula 3.3

PASO 6.- Incrementar el contador de tiempo.

PASO 7.- Graficar la distribución de concentraciones en $B(N)$ (Opcional).

PASO 8.- Hacer $A(n) = B(n)$ con $n=1, 2, \dots, N-1$ para que la concentración de $A(N) = 0$ hipótesis a).

PASO 9.- Calcular y poner el nuevo valor de $A(0, t)$. Saltar al paso 5.

Este programa fué desarrollado en lenguaje BASIC, y su listado aparece en el anexo P1.

3.3.10 Obtención del coeficiente de difusión de peróxido

Debido a que uno de los parámetros en la simulación del proceso es el coeficiente de difusión de peróxido de hidrógeno en la membrana, para su evaluación, se simuló el proceso de difusión llevado a cabo en el electrodo con el

uso de métodos numéricos. De esta forma, comparando los resultados de la simulación con la curva de respuesta medida del electrodo, puede encontrarse el coeficiente de difusión del peróxido de hidrógeno.

Para obtener la respuesta del electrodo y poder comparar los datos de la simulación, fue muestreada con el uso de una computadora la respuesta del electrodo, vía una interface con una resolución de 5.5 dígitos y un tiempo de muestreo constante aproximado de 5 seg. De esta forma se tomaron los datos a los que se ajustaría el modelo, en el proceso de obtención del coeficiente de difusión para el peróxido de hidrógeno.

Al ajustar los valores al modelo, fue obtenido el coeficiente de difusión para peróxido de $3.2E-7$ cm²/seg, resultando una solución única, en la variación del coeficiente de difusión, aunque depende un poco de criterios personales de ajuste ver fig 3.4

La simulación obtenida es como la esperada para el electrodo (ver fig 3.3). En esta figura puede verse que la distribución de concentraciones parte de la condición inicial "escalón" y llega a un estado estacionario. En ese estado, la segunda derivada de la concentración es cero, por lo que es congruente con la ecuación de difusión en estado estacionario; además de satisfacer la hipótesis a) en el electrodo.

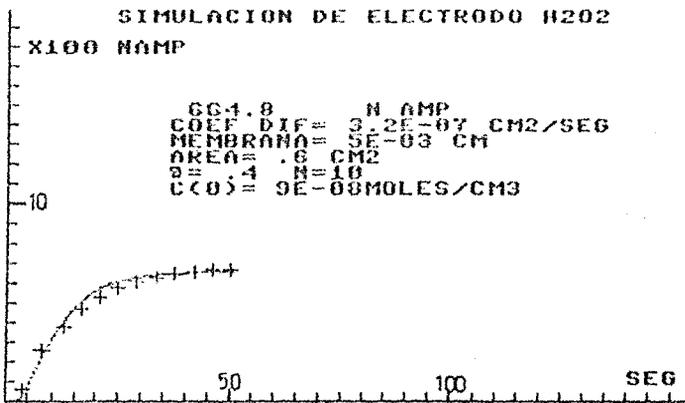


fig. 3.3

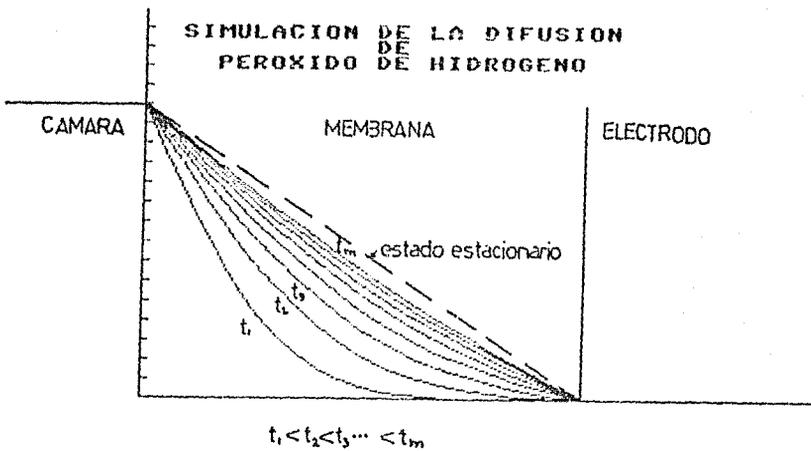


fig. 3.4

3.4 Descripción de la segunda parte de la formulación del modelo.

En esta etapa del desarrollo del modelo, será incorporado a la especie peróxido trabajada en la parte 1, la especie glucosa. En este proceso, al igual que en la parte 1), no será impuesta ninguna limitante a la medición, que no sea el transporte de las especies debida a la difusión (hipótesis a).

A continuación será descrito el proceso llevado a cabo en el electrodo enzimático, cuando se considera que no existe ninguna limitante debido al O_2 o la velocidad de reacción, y es inyectada una muestra de glucosa.

Consideraremos en esta ocasión a la membrana, como un par de membranas (de celofán); encontrándose entre ellas la enzima soluble (ver Principio de medición para glucosa Cap 1). Estas membranas, debido al tamaño de su poro, permiten el paso de las especies glucosa y peróxido con coeficientes de difusión D_B, D_P respectivamente, pero impiden el paso de la enzima, quedando atrapada en una región que será llamada "zona enzimática". Lo anterior es relativamente fácil de lograr, debido al gran tamaño de la enzima respecto a la glucosa; y hace posible el que la enzima pueda ser reutilizada en otros análisis, debido a que sólo las especies glucosa y peróxido son desplazadas durante el lavado.

Considerando que inicialmente tanto la membrana como la cámara de medición se encuentran libres de peróxido o

glucosa, cuando es inyectada la muestra de glucosa, automáticamente es diluida en una proporción constante y empieza a difundirse a través de la primera membrana. Esta glucosa después de viajar por un tiempo (en un proceso controlado por difusión), se encuentra con la enzima; que la descompone, generandose como parte de esta reacción peróxido de hidrógeno (como hipótesis a esta etapa del modelo, toda la glucosa que llega a esta zona, es descompuesta). El peróxido de hidrógeno generado, sigue al igual que la glucosa un proceso de difusión, que lo lleva con el tiempo a encontrarse con el detector de peróxido de hidrógeno; que por efecto del potencial entre sus electrodos, desplaza hacia ellos los iones en los que se descompone el peróxido, facilitando la descomposición de otras moléculas de peróxido. Estos iones, al reaccionar en los electrodos, generan una corriente, que es la señal registrada electrónicamente.

3.4.1 Parámetros. Variables de entrada salida.

En esta parte del modelo, los parámetros manejados son:

Número de particiones en la membrana
Area del electrodo .
Grosor de la membrana .
Coeficiente de difusión de peróxido.
Coeficiente de difusión de glucosa .

Las variables de entrada manejadas son:

Concentración inicial de peróxido .

Concentración inicial de glucosa .

La variable de salida es:

Corriente eléctrica del electrodo .

3.4.2 Hipótesis para la construcción del modelo parte 2.

Para la formulación de esta parte del modelo, supondremos además de las hipótesis a)-f) usadas en la parte 1 antes mencionada, las siguientes hipótesis de trabajo:

g) El transporte de la glucosa está controlado por difusión.

h) La liberación de peróxido en la zona de la enzima es instantánea. Esto está respaldado por la gran actividad de las enzimas (ver sección 1.1 pag.2).

i) Toda la glucosa que pasa por la zona enzimática es catalizada. Sostenida por la concentración de enzima en la membrana y la no limitación de oxígeno supuesta. Aunque esta consideración en la realidad no es tan válida, si puede considerarse como un caso límite, en el tratamiento de bajas concentraciones de glucosa.

j) La liberación de peróxido es proporcional al flujo de glucosa a la zona enzimática. Esto es consecuencia de la cantidad de enzima, así como de su actividad. Esta hipótesis es importante, y fuerza a que la respuesta del electrodo sea lineal (ver variables importantes en la señal cap 2).

k) Es posible describir el proceso, como la superposición de dos procesos de difusión independientes, con acoplamiento únicamente en las condiciones de frontera.

Esto quiere decir que los coeficientes de difusión de cada una de las especies, no serán afectados por cambios en la concentración de las especies presentes. Esta hipótesis es razonable, debido a las bajas concentraciones usadas.

3.4.3 Simulación numérica de la parte 2 del modelo

La simulación en esta parte, consiste en representar el proceso antes mencionado (sección 3.4), con el uso de métodos numéricos.

Tomemos ahora como en el caso de la etapa 1, en cada una de las membranas una partición de $N-1$, dejando una sección de éstas para la región enzimática. Con esto, se tiene como sección diferencial $DX=U/(2N-1)$; con U el grosor de la membrana y designemos como $C(n, e, t)$ la concentración en la región n , de la especie e (g glucosa, p peróxido) y en el tiempo t .

Como es de esperarse, según la hipótesis i) en esta etapa de simulación, debe cumplirse la condición de frontera $C(n, g, t)=0$ para $n=N$ y de forma similar para el peróxido $C(2N, p, t)=0$ (región que representa al electrodo).

Como en esta etapa del modelo se trabaja con la difusión simultánea de dos especies, de forma similar a la etapa 1, es necesario el encontrar la distribución de concentración en el tiempo para cada una de ellas; así como considerar los cambios en las condiciones de frontera, debido a su difusión por la membrana. A continuación se expondrán las reglas para la simulación.

3.4.4 Obtención de las ecuaciones de diferencias.

Como en esta parte del desarrollo del modelo no se impone ninguna limitación en la actividad enzimática, la glucosa que se difunde desde la cámara de medición, "ve" a la zona enzimática como el peróxido en la parte I "ve" a el electrodo (ver fig. 3.5). Es por esto que la ecuación de diferencias es la misma a la obtenida en la etapa I para el peróxido, cambiando el coeficiente de difusión de peróxido por el de glucosa; por lo que la ecuación de diferencias para glucosa es:

$$C(n, g, t+Dt) = C(n, g, t) - DG * Dt * (C(n-1, g, t) - 2C(n, g, t) + C(n+1, g, t)) / (DX+2) \quad \dots 3.8$$

con $N(n, 0)$, DG el coeficiente de difusión de la glucosa y g indicando la especie a tratar, en este caso glucosa (ver fig 3.5).

Para la obtención de la ecuación de diferencias del peróxido, de forma similar a la etapa I (ec. 1.3), la distribución de concentración de peróxido, en la región entre la zona enzimática y el electrodo, está dada por la ecuación de diferencias:

19

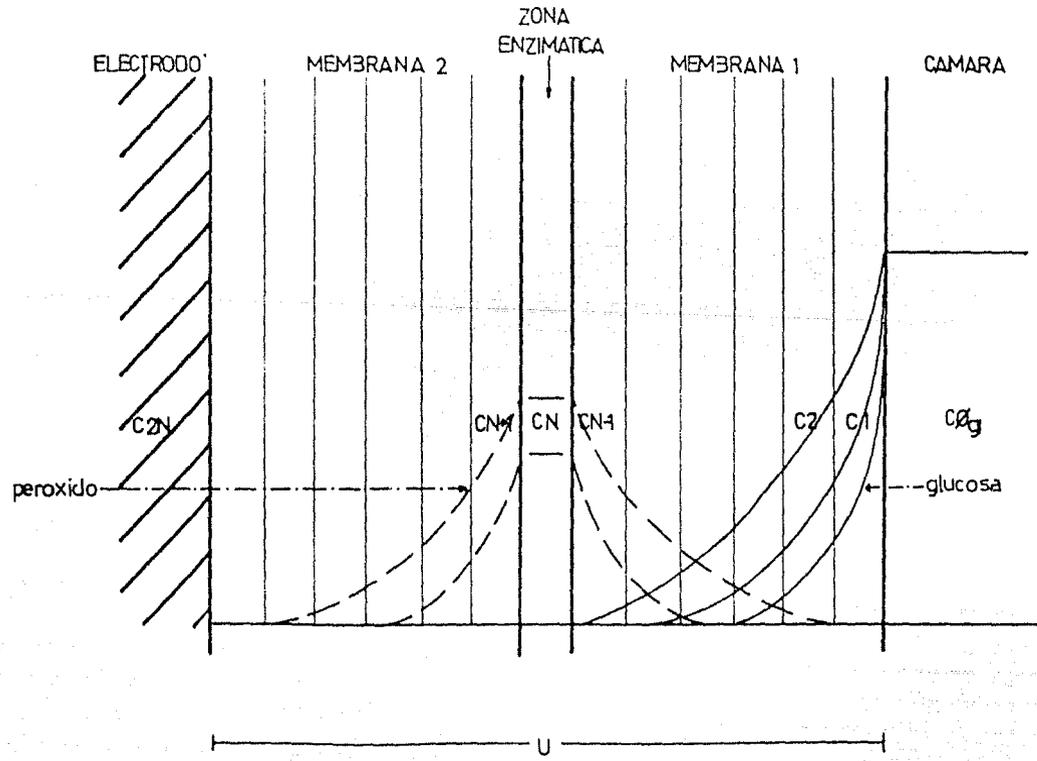


fig. 3.5 SIMULACION ETAPA 2

$$C(n, p, t+Dt) = C(n, p, t) - DP * D * (C(n-1, p, t) - 2 * C(n, p, t) + C(n+1, p, t)) / (DX^2) \quad \dots 3.9$$

con $2N+1$ en N y con una concentración en la frontera $C(N, p, t)$ igual a la concentración de peróxido en la zona enzimática de forma similar a la concentración que "vería" la glucosa en la cámara de medición. El cálculo de la concentración de peróxido en la zona enzimática, será realizado a continuación.

3.4.5 Concentración de peróxido en la zona enzimática

Si se considera a la zona enzimática como un pequeño depósito de peróxido, cuya concentración por un lado es incrementada al liberarse peróxido de la glucosa (acción representada por el flujo $F1$), y reducida por la difusión de peróxido hacia el electrodo y la cámara de dilución (representado en el flujo $F2$); además de suponer que la salida del peróxido al electrodo y la cámara es igual por la simetría del sistema, la concentración a la frontera de peróxido, cuyo caso es similar a la concentración de glucosa en la cámara de dilución, está dada por (ver fig 3.5)

$$F1 = A * (2N-1) * DG * C(N-1, g, t) / U$$

$$F2 = 2 * A * (2N-1) * DP * (C(N, p, t) - C(N+1, p, t)) / U$$

$$C(N, p, t+Dt) = C(N, p, t) + (F1 - F2) * DT / (A * DX) \quad \dots 3.10$$

en donde $F1$ es obtenido de forma similar al flujo detectado

por el electrodo en la etapa 1, con $C(N-1, g, t)$ obtenido de la ecuación de diferencias 3.3 y F_2 es el flujo de salida provocado por la difusión de peróxido en las membranas. La ecuación 3.10, representa la condición de frontera para la difusión de peróxido, de forma similar a la concentración de glucosa en la cámara de dilución en la difusión de la glucosa.

3.4.6 Concentración de glucosa en la cámara de dilución.

El cambio en la concentración de la cámara de dilución debida al flujo de glucosa a través de la membrana, está dada por:

$$C(0, g, t+Dt) = C(0, g, t) - DG * A * (C(0, g, t) - C(1, g, t)) / DX \quad ..3.11$$

esta ecuación es similar a la de la concentración de peróxido en la cámara de medición en la parte I de la formulación del modelo.

3.4.7 Sincronización de los procesos de difusión

Debido a que en realidad, se está tratando con dos procesos de difusión acoplados, es necesario que en la simulación final, ambos procesos tengan incrementos de tiempo iguales para cada iteración. Para lograr esto, debe cumplirse la igualdad:

$$Dt = @p * DX + 2 / DP = @g * DX + 2 / DG \quad ..3.12$$

en donde $\theta(g) < .5$, $\theta(p) < .5$, son constantes que determinan los incrementos de tiempo entre iteración (ver Estabilidad del método sección 3.3.5). Por tanto si fijamos $\theta p = .4$, implica que (ver obtención del coeficiente de difusión para peróxido)

$$Dt(\text{seg}) = .4 * ((DX)^2) / 3.2E-7 \quad \dots 3.13$$

y de la ecuación 3.10

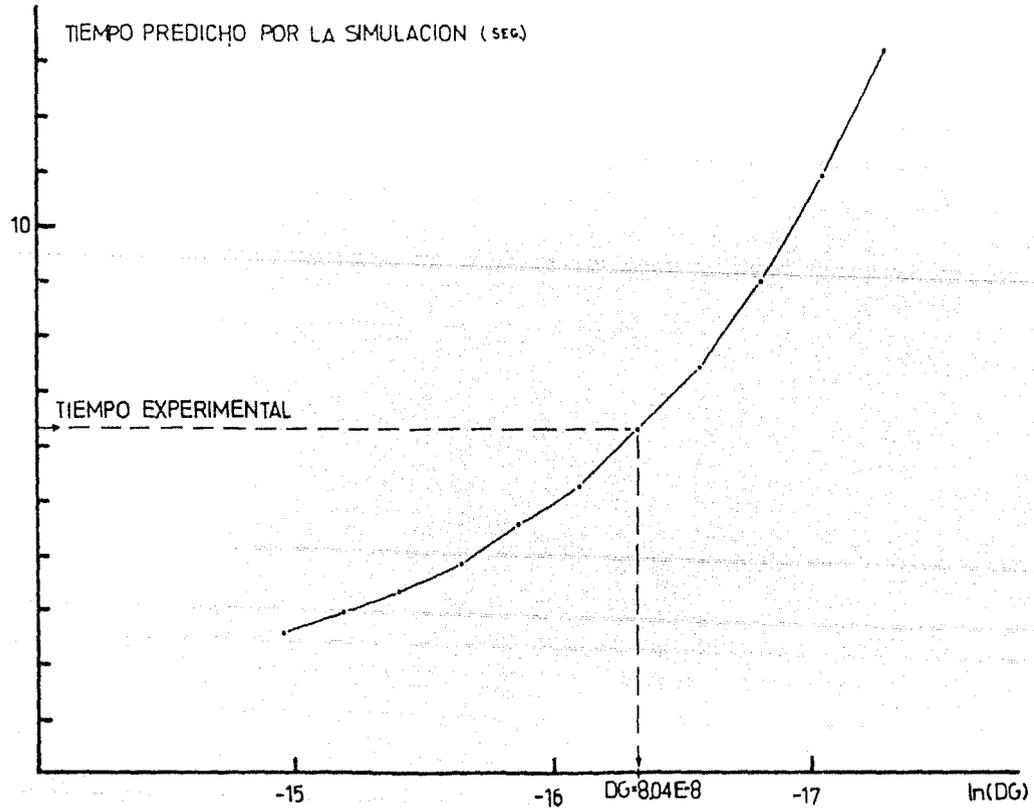
$$DG = \theta g * DX^2 / Dt \quad \dots 3.14$$

3.4.8 Lectura equivalente en el electrodo.

La corriente entregada por la descomposición de peróxido de hidrógeno, está dada por:

$$\text{Lectura } n_{amp}(t) = 2 * DP * A * N_a * e * (1E9) * C(2N, p, t) / DX \quad \dots 3.15$$

de forma similar a la ecuación 3.6 de la etapa 1, y representa la lectura equivalente a la respuesta experimental del electrodo enzimático.



AJUSTE DEL COEFICIENTE DE DIFUSION
DE GLUCOSA

fig.3.6

3.4.9 DESCRIPCION DEL PROGRAMA PARA LA SIMULACION

DE LA ETAPA 2 DEL MODELO

PASO 1.- Reservar cuatro regiones de memoria $A(N)$, $B(N)$, $C(N)$ y $D(N)$, para almacenar las distribuciones de concentraciones en la membrana en el tiempo t y $t+Dt$ respectivamente, para cada una de las especies.

PASO 2.- Introducir las variables del sistema.

PASO 3.- Iniciar el contador de tiempo CT . El tiempo de simulación estará dado por $Dt*CT$.

PASO 4.- Poner en la región $A(n)$, $C(n)$ con $0(n) \leq 2N$, la distribución de glucosa y el peróxido respectivamente, al tiempo cero.

PASO 5.- Poner en $B(n)$ y $D(n)$, el valor de la concentración al tiempo $t+Dt$ para glucosa y peróxido, según la fórmula 3.8 para la especie respectiva.

PASO 6.- Incrementar el contador de tiempo.

PASO 7.- Según la ecuación 3.11 corregir la variación en la concentración de la cámara de medición.

PASO 8.- Según la ecuación 3.10 corregir la concentración de peróxido en la zona de reacción.

PASO 9.- Graficar el flujo de corriente según la ecuación 3.15 (opcional).

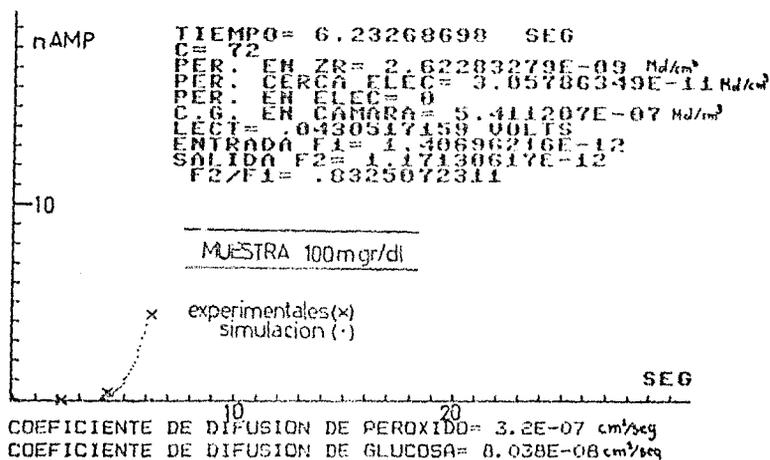
PASO 10.- Hacer $A(n)=B(n)$; $C(n)=D(n)$ con $n=1,2,..2N$. Saltar al paso 5.

3.4.10 Obtención del coeficiente de difusión de glucosa.

Una vez obtenido el programa de simulación que se

encuentra en el anexo P2, para evaluar el coeficiente de difusión a la glucosa, es necesario probar diferentes θ_0 hasta ajustar la simulación del modelo a la lectura obtenida experimentalmente un tiempo constante y pequeño (aprox. 6 seg) después de la inyección; esto es con el fin de evitar al máximo posible la pérdida de actividad de la enzima. De esta simulación, fué obtenido un coeficiente para la glucosa de $D_5=0.04 \text{ cm}^2/\text{seg}$, (ver fig 3.6); y no obstante que el ajuste fué hecho sobre la lectura a los 6 segundos de la inyección, se representa con bastante fidelidad la respuesta inicial del electrodo (ver fig. 3.7).

Después de esto, fué simulado el resto del proceso, encontrando en el estado estacionario provocado por la difusión de glucosa, una lectura y tiempo de respuesta mayor al obtenido experimentalmente, (ver fig 3.8). Además de esto, es interesante el observar que el tiempo de respuesta medido para la glucosa, es menor al observado para el peróxido (comparar fig.3.3 y 4.5). Esto conduce, a que posiblemente el estado estacionario alcanzado experimentalmente en la medición de altas concentraciones de glucosa, se debe al transporte de oxígeno, y no al de glucosa; posibilidad que será incorporada en la siguiente parte del modelo.



PREDICION DE LA RESPUESTA INICIAL

DEL ELECTRODO

fig.37

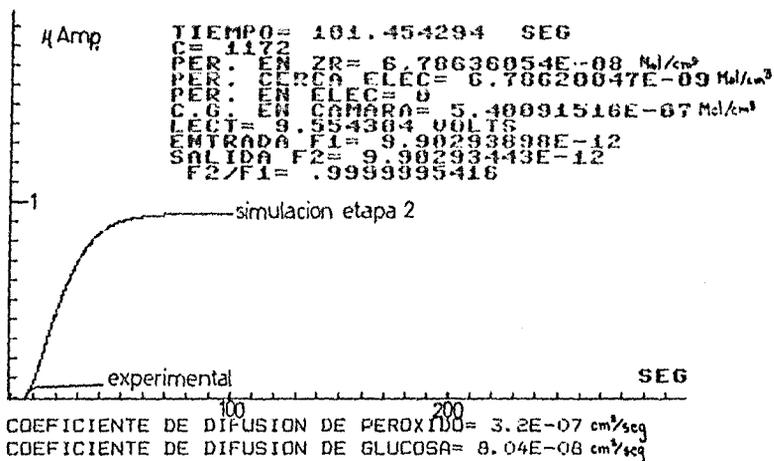


fig.38

3.5 Descripción de la tercera parte del desarrollo del modelo.

Esta etapa del desarrollo del modelo, consiste en incorporar a la parte 2 antes trabajada, la posibilidad de cambios en la actividad enzimática, por lo que el proceso a simular es básicamente el descrito en la parte 2; con modificaciones en el transporte de oxígeno disuelto y el paso de glucosa a través de la zona enzimática. Debido a esto, en esta sección serán descritas únicamente los cambios introducidos a la parte 2.

Para la descripción del oxígeno disuelto, se considerará a la cámara de dilución como un suministro de oxígeno disuelto; y a la zona enzimática como la región de reacción en la que es "transformada" la glucosa en peróxido, según una función de transferencia llamada "función de actividad". Inicialmente antes de la inyección de una muestra de glucosa, la concentración de oxígeno disuelto es homogénea a lo largo de toda la membrana, así como en la cámara de dilución. Cuando se inyecta la muestra y llega hasta la zona enzimática, la reacción de la enzima con la glucosa empieza a hacer uso del oxígeno disuelto en la región enzimática, disminuyendo su concentración y forzando la aparición de un flujo neto de oxígeno desde la cámara. El suministro de este oxígeno tenderá a alcanzar un estado estacionario, que posiblemente sea el estado estacionario observado experimentalmente, explicando con ello el tiempo de respuesta medido (ver fig. 3.9).

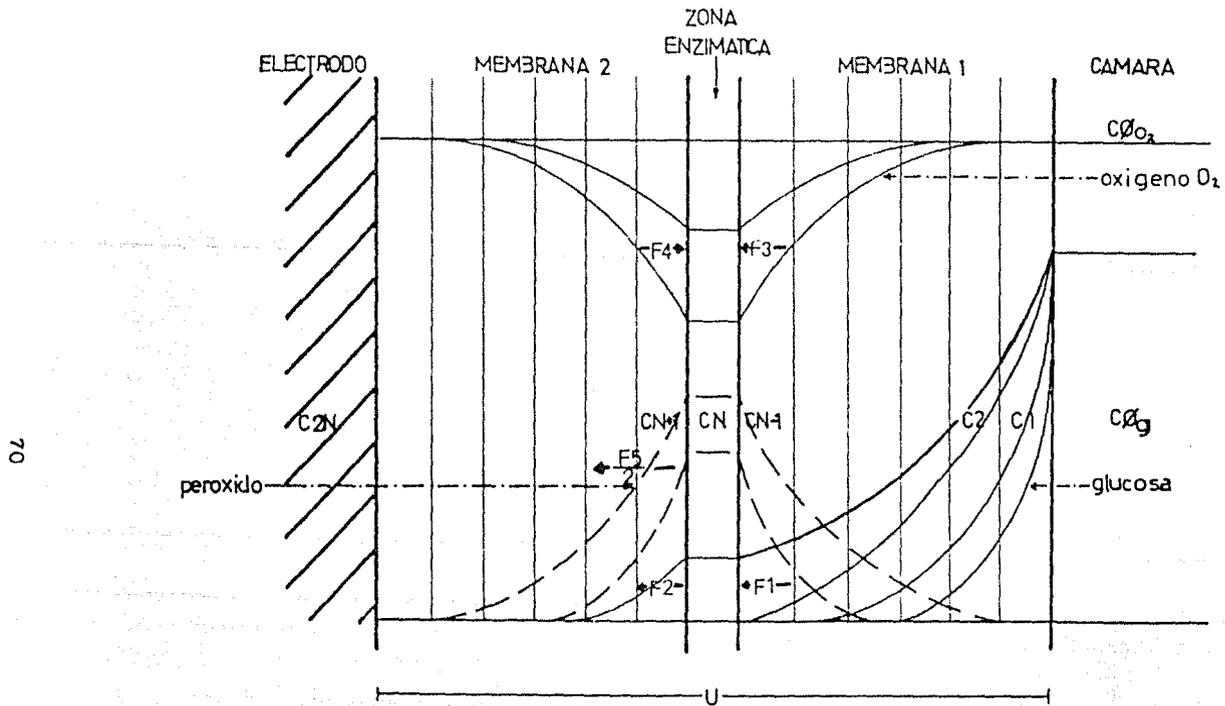


fig. 3.9 SIMULACION ETAPA 3

En un caso extremo, el oxígeno disuelto en la cámara puede agotarse, impidiendo el que siga reaccionando la enzima, no obstante exista aún glucosa de la muestra (ver sección 2.5.2).

La actividad enzimática, como ya se mencionó antes, está descrita en este caso por la llamada Función de Actividad, con la cual se contempla la posibilidad de que no exista interacción entre la glucosa y la enzima, ya sea por un simple no encuentro por causas estadísticas, hasta la inhibición de la enzima por falta de oxígeno. De igual forma que en la parte 2, la glucosa que reacciona genera peróxido de hidrógeno, que viaja a través de la membrana para ser descompuesto en los electrodos y genera una corriente que es la lectura entregada por el detector de peróxido de hidrógeno.

3.5.1 Parámetros. Variables de entrada y salida.

En esta parte del modelo, los parámetros manejados son:

- Número de particiones en la membrana
- Area del electrodo .
- Grosor de la membrana .
- Coefficiente de difusión de peróxido.
- Coefficiente de difusión de glucosa .
- Coefficiente de difusión de oxígeno .
- Concentración inicial de O₂ .
- Actividad enzimática máxima .
- Concentración de actividad media .
- Concentración de saturación de O₂ .

La variable de entrada en esta parte es la concentración inicial de glucosa y la variable de salida, al igual que en las otras partes, es la corriente eléctrica generada por el electrodo.

3.5.2 Hipótesis para la simulación de la parte 3.

Esta etapa incorpora a la parte 2 del desarrollo del modelo la posibilidad de alteraciones en la capacidad de reacción de la enzima, siendo atribuida esta pérdida de actividad a:

- I) Cambio de probabilidad de encuentro entre la glucosa y la enzima, debido al cambio en la concentración.
- II) El efecto de saturación observada experimentalmente en la reacción de la enzima, debido al tiempo de reacción de la enzima y la glucosa.
- III) La limitación por oxígeno, por ser éste un elemento indispensable en la interacción de la enzima con la glucosa (ver Secc. 1.1).

Estas consideraciones en la pérdida de actividad en la enzima, serán agregadas a las utilizadas en la parte 2 del modelo (con excepción de la hipótesis i por dejar de ser válida), y pueden ser agrupadas en las hipótesis de trabajo siguientes.

- 1) La glucosa puede o no, ser catalizada en la zona enzimática. Esta probabilidad es designada por una función "ACTIVIDAD", que es función de las concentraciones de los elementos en reacción.

m) El oxígeno, parte importante en la reacción, es representado en su transporte por una ecuación de difusión en una dimensión.

o) La actividad enzimática, no podrá ser superior a la permitida por las concentraciones en la región enzimática. Esto es, la función de actividad es tomada como una actividad máxima, dejando a las concentraciones de los reactivos la limitación real (no puede consumir más oxígeno o glucosa de la que existe disponible en el momento).

3.5.3 Simulación por diferencias finitas de la parte 3.

En las siguientes secciones nos limitaremos a obtener las modificaciones necesarias, a partir de lo obtenido en la etapa 2, en lo concerniente al transporte del oxígeno y al cambio en la actividad enzimática; cambios que a continuación serán descritos.

3.5.4 Ecuaciones de diferencias.

Debido a que existe la posibilidad de que la glucosa pase a través de la zona enzimática, es necesario el obtener la ecuación de diferencias para la glucosa en la región comprendida entre la zona enzimática y el detector de peróxido. Esta ecuación es similar a la obtenida para la glucosa en la parte 2, sólo que en este caso, los índices en los que debe evaluarse deben corresponder a la región requerida. La ecuación de diferencias para la glucosa, está dada por:

$$C(n, g, t+Dt) = C(n, g, t) - Dg \cdot Dt \cdot (C(n-1, g, t) - 2C(n, g, t) + C(n+1, g, t)) / (DX+2) \quad \dots 3.16$$

con $0 \leq n \leq N$; $N \leq n \leq 2N$, para considerar las regiones destinadas a las membranas.

La ecuación de diferencias para la descripción del oxígeno, es similar a la 3.15, y está dada por:

$$C(n, o, t+Dt) = C(n, o, t) - Do \cdot Dt \cdot (C(n-1, o, t) - 2C(n, o, t) + C(n+1, o, t)) / (DX+2) \quad \dots 3.17$$

con $0 \leq n \leq N$; $N \leq n \leq 2N$, para considerar las regiones destinadas a las membranas, "o" indica que se trata con oxígeno y Do es el coeficiente de difusión del oxígeno en las membranas.

La ecuación de diferencias para el peróxido no se altera, por lo que no será nuevamente escrita.

3.5.5 Función de actividad.

La representación de la actividad enzimática sin limitación de oxígeno, es descrita por la ecuación de Michaelis (ref 12):

$$Ae = VM \cdot C(N, g, t) / (KM + C(N, g, t)) \quad \dots 3.18$$

en donde Ae se usa para designar la velocidad promedio con la que es catalizada la glucosa por la enzima (actividad

enzimática (mol/seg), VM es la actividad enzimática máxima en saturación de glucosa, KM es la concentración con la que se obtiene la mitad de la actividad máxima y C(N,g,t) la concentración de glucosa en la zona enzimática. Esta ecuación cumple con los resultados observados experimentalmente en la actividad enzimática (ref.2 Cap.14-4); por un lado parte de cero a concentración cero, tiene un incremento lineal en el cual es representado el aumento de la probabilidad de encuentro con el aumento de concentración, y luego tiende asintóticamente a la velocidad de actividad máxima, para representar el efecto del tiempo de reacción de la enzima y el tener un número limitado de moléculas de enzima en la membrana.

En la ecuación 3.18 pag.74, es considerado que las condiciones de oxigenación son las mejores y por tanto, no está considerado el efecto causado por una posible limitación de oxígeno. Para introducir esta limitación a la ecuación 3.18, es propuesta la expresión:

$$A_e = V_M * C(N, g, t) * C(N, o, t) / ((K_M + C(N, g, t)) * S_0) \quad \dots 3.19$$

en donde C(N,o,t) es la concentración de oxígeno en la zona enzimática y S0 la concentración de saturación de oxígeno, a la que es evaluada la ecuación 3.18 (aprox 3.2E-7 mol/cm³). Esta ecuación da un comportamiento razonable, ya que cuando la concentración de oxígeno en la zona de reacción es la de saturación S0, se reduce a la ecuación 3.18 y en

ausencia de oxígeno, la actividad enzimática es nula (lo cual es esperado, debido a la dependencia con el oxígeno en la ecuación 2.2).

3.5.6 Sincronización de los procesos

Como este proceso implica la superposición de la difusión de tres especies (glucosa, peróxido y oxígeno), es necesario al igual que en la sección 3.6.7, el forzar que los incrementos de tiempo en cada uno de los procesos sea el mismo. Para lograr esto, debe cumplirse:

$$\Delta t = \alpha_p \cdot (\Delta X)^2 / D_p = \alpha_g \cdot (\Delta X)^2 / D_g = \alpha_o \cdot (\Delta X)^2 / D_o \quad \dots 3.20$$

con α_i constante ($0 < \alpha_i < 0.5$) para cada una de las especies. De esta forma si $\alpha_o = 0.2$ y si son considerados los coeficientes de difusión, entonces se tiene que:

$$\alpha_p = 0.2 \cdot D_p / D_o \quad \dots 3.21$$

$$\alpha_g = 0.2 \cdot D_g / D_o \quad \dots 3.22$$

$$\Delta t = \alpha_o \cdot (\Delta X)^2 / D_o \quad \dots 3.23$$

De esta forma, por ser el coeficiente de difusión del oxígeno el mayor entre las especies manejadas (esto es considerando su tamaño relativo al peróxido o la glucosa), se garantiza que las constantes α_p y α_g sean menores a 0.2, garantizando la estabilidad del método numérico, además de imponer a cada uno de los procesos incrementos de tiempo

iguales en cada iteración.

3.5.7 Cambios de las concentraciones en la cámara de medición.

La única corrección adicional en la cámara de medición a las manejadas en la parte 2, es la debida al oxígeno disuelto. Para considerar un agotamiento de oxígeno en la cámara de medición, el oxígeno utilizado en la reacción debe ser restado al oxígeno disponible. Esta corrección, de forma similar a la encontrada para la glucosa en la secc 3.6.3, está dada por:

$$C(0, o, t+Dt) = C(0, o, t) - DO * A * (C(0, o, t) - C(1, o, t)) / DX \quad \dots 3.24$$

con $C(0, o, t)$ la concentración de oxígeno en la cámara de medición al tiempo t , DO el coeficiente de difusión del oxígeno y DX el grueso de la partición en la membrana.

3.5.8 Cambios de las concentraciones en la zona enzimática.

A continuación serán obtenidos los flujos netos de las especies manejadas (glucosa, peróxido y oxígeno) hacia la zona enzimática, para poder evaluar la concentración de cada una de las especies en esta región.

Debido a que la glucosa puede pasar por la zona enzimática sin reaccionar (debido a la pérdida de actividad), el flujo de entrada de glucosa a la zona de reacción está dado por $(F1-F2)$ con:

$$F1=A*DG*(A(N-1,g,t)-A(N,g,t))/DX \quad ..3.25$$

$$F2=A*DG*(A(N,g,t)-A(N+1,g,t))/DX \quad ..3.26$$

en donde F1 es el flujo considerado en la etapa 2 desde la cámara de medición, y F2 el flujo resultante de la posibilidad que la glucosa pase sin reaccionar en la zona enzimática,

El flujo neto de entrada de oxígeno a la zona enzimática, de forma similar a la glucosa, está dado por (F3-F4) con:

$$F3=A*DO*(E(N-1,o,t)-E(N,o,t))/DX \quad ..3.27$$

$$F4=A*DO*(E(N),o,t)-E(N+1,o,t))/DX \quad ..3.28$$

en donde E(n), es como se representa la región de memoria para guardar la distribución de concentración del oxígeno, al tiempo t.

De forma similar a la ecuación 3.7, será designado por F5 el flujo de salida del peróxido en la zona enzimática, y está dado por:

$$F5=2*A*DP*(C(N,p,t)-C(N+1,p,t))/DX \quad ..3.29$$

3.5.9 Concentración de peróxido en la zona enzimática

En este caso, la concentración de peróxido en la zona enzimática, está determinada por la presencia de dos

efectos: uno de ellos la llegada y conversión de glucosa a peróxido por la enzima (descrito por la función de actividad) y el otro, debido a la salida de peróxido por su difusión hacia el electrodo y la cámara de medición. De esta forma, la concentración de peróxido en la zona de reacción, está dada por:

$$C(N, p, t+Dt) = C(N, p, t) - F5 * Dt / (A * DX) + NM / (A * DX) \quad \dots 3.30$$

en donde NM es el número de moléculas que han reaccionado en el intervalo de tiempo Dt, resultado de la actividad enzimática, y está dado por la ecuación:

$$NM = A_e * Dt \quad \dots 3.31$$

y donde $C(N, p, t)$, se usa para designar la concentración de peróxido en la zona enzimática al tiempo t.

3.5.10 Corrección de oxígeno en la zona enzimática

Después de encontrar el número de moléculas que reaccionaron (NM) y sabiendo que la reacción es uno a uno con el oxígeno disuelto y la glucosa, entonces tenemos que la concentración final de oxígeno, está dado por:

$$E(N, o, t+Dt) = E(N, o, t) + (F3 - F4) * Dt / (A * DX) - NM / (A * DX) \quad \dots 3.32$$

en esta ecuación, la $E(N, o, t)$ designa la concentración de

oxígeno en la zona enzimática al tiempo t , $(F3-F4)$ el flujo neto de oxígeno a la zona enzimática y $NM/(A*DX)$ el cambio en la concentración debido a la transformación de glucosa en peróxido.

3.5.11 Corrección de glucosa en la zona enzimática.

De forma similar a lo obtenido para el oxígeno, la concentración de glucosa en la zona enzimática debe ser corregida constantemente, para considerar su reducción con la reacción de la enzima. Este ajuste está descrito por la expresión:

$$A(N, g, t+Dt) = A(N, g, t) + (F1-F2) * Dt / (A*DX) - NM / (A*DX) \quad \dots 3.33$$

en la que $A(N, g, t)$ designa la concentración de glucosa al tiempo t en la zona de reacción (N) y $(F1-F2)$ el flujo neto de glucosa a la zona enzimática.

3.5.12 Oxígeno entregado por el electrodo.

Para verificar el completo consumo de glucosa por el electrodo, se inyectó una muestra de 1200 mgr/dl de glucosa en la cámara de medición y se dejó que fuera "consumida" por el electrodo. Después de lo anterior, fué evaluada la cantidad de glucosa equivalente en la reacción, resultando ser insignificante en relación a lo esperado teóricamente (1/4000 la carga esperada en la descomposición de la glucosa inyectada). Debido a que por cada dos moléculas de peróxido

que reaccionan en el electrodo, debe generarse una molécula de O_2 , el que la reacción de la glucosa sea en un factor tan pobre, indica que el oxígeno generado en el electrodo, aparentemente no participa en la reacción de la glucosa con la enzima; posiblemente debido a la oxidación del electrodo (ref 19) o a su acumulación en forma de burbujas. De cualquier forma, este oxígeno en principio disponible, no lo es tanto.

3.5.13 DESCRIPCION DEL PROGRAMA PARA LA SIMULACION DE LA PARTE 3 DEL MODELO.

PASO 1.- Reservar las regiones de memoria (de $2N$ cada una), para almacenar las distribuciones de concentraciones de cada especie al tiempo t y $t+Dt$. Se asignaron para el tiempo t $A(N), C(N), E(N)$ y para $t+Dt$ $B(2N), D(2N), F(2N)$ para glucosa peróxido y oxígeno respectivamente.

PASO 2.- Introducir las variables del sistema, así como las condiciones iniciales y de frontera en las concentraciones.

PASO 3.- Iniciar el contador de tiempo CT . El tiempo de simulación está dado por $Dt*CT$, con Dt el incremento de tiempo entre iteraciones.

PASO 4.-. Calcular y depositar a partir de las distribuciones de concentraciones al tiempo t , la concentración al tiempo $t+Dt$ para cada una de las especies, en la región de las membranas $0(N < N < N(2N$. Lo anterior es mediante el uso de la ecuación de diferencias 3.16 para la

especie respectiva.

PASO 5.- Corregir las concentraciones en la cámara de medición para la glucosa y el oxígeno, según las ecuaciones 3.11, 3.24 respectivamente.

PASO 6.- Evaluar NH según la ecuación 3.31, para corregir las concentraciones en la zona enzimática.

PASO 7.- Verificar que el número de moléculas reaccionado no sea mayor al existente. En caso contrario, la limitación estará descrita por la concentración de oxígeno en la zona de reacción, y no por la función de actividad.

PASO 8.- Evaluar la concentración de todas las especies en la zona enzimática, según las ecuaciones 3.30, 3.32, 3.33.

PASO 9.- Incrementar el contador de tiempo.

PASO 10.- Graficar el flujo de corriente según la ecuación 3.15.

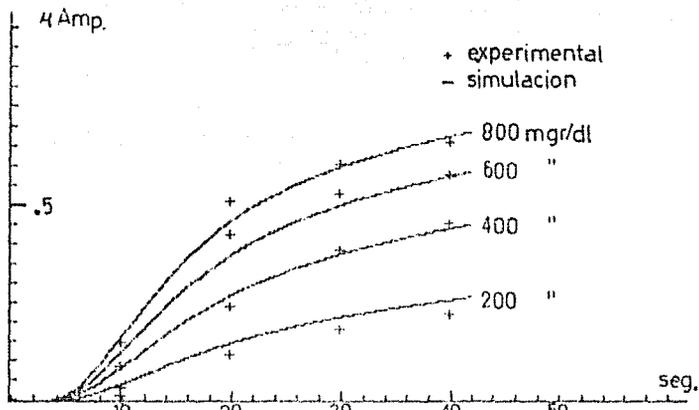
PASO 11.- Hacer $t=t+Dt$, transfiriendo los datos de las regiones asignadas para el tiempo $t+Dt$ a las del tiempo t .

PASO 12.- Repetir el proceso saltando al PASO 4 ; sólo que en este momento, las condiciones iniciales y de frontera han sido ajustadas de forma tal, que representan un avance de Dt en el tiempo del proceso simulado.

3.5.14 RESULTADOS

Este programa puede encontrarse en el anexo F3 y predice bien el comportamiento observado experimental, en el tiempo de respuesta de la medición de glucosa, la pérdida de linealidad observada experimentalmente y el aumento en el intervalo lineal con la disminución del tiempo de muestreo T_M (ver fig 3.10).

En función de los resultados obtenidos con este modelo, puede decirse que el estado estacionario observado experimentalmente en la medición de altas concentraciones de glucosa, es alcanzado por una limitación de oxígeno, y no por la glucosa.



COEFICIENTE DE DIFUSION DE PEROXIDO= $4.25 \cdot 10^{-7}$ CM²/SEG
 COEFICIENTE DE DIFUSION DE GLUCOSA= $8.08000001 \cdot 10^{-8}$ CM²/SEG
 COEFICIENTE DE DIFUSION DE OXIGENO= $5.2 \cdot 10^{-7}$ CM²/SEG
 CONCENTRACION INICIAL DE OXIGENO= $4.44 \cdot 10^{-8}$ MOLES/CM³
 ACTIVIDAD ENZIMATICA MAXIMA= $1 \cdot 10^{-9}$ MOLES/SEG
 CONCENTRACION (G) DE ACTIVIDAD MEDIA= $1.8 \cdot 10^{-5}$ MOLES/CM³
 CONCENTRACION DE SATURACION PARA O₂= $3.2 \cdot 10^{-7}$ MOLES/CM³

GRUESO DE LA MEMBRANA= $3.5 \cdot 10^{-3}$ CM

SIMULACION ETAPA 3

fig.3.10

CAPITULO 4
CARACTERIZACION Y
EVALUACION EN HOSPITAL

RESUMEN

En este capítulo, será mostrada la caracterización del electrodo enzimático en su confiabilidad es decir su sensibilidad, reproducibilidad, exactitud, especificidad y además, en sus características de aplicabilidad como son el tiempo de análisis, tamaño de la muestra, facilidad de uso, posibilidad de medición de otros sustratos. Esta evaluación es llevada a cabo en condiciones de laboratorio, como lo es la medición de glucosa en soluciones en agua destilada, y en condiciones de trabajo, con su evaluación y comparación con el método de absorción UV (340 nm), en la determinación de glucosa en suero sanguíneo, plasma y sangre completa. Este último está encaminado a determinar la existencia de posibles interferencias en la medición de glucosa en soluciones sanguíneas, verificando la posibilidad de su futuro uso como un método alternativo de análisis en el área clínica.

Como resultado de la evaluación realizada, puede concluirse que éste método de análisis es equivalente en confiabilidad, al método de absorción ultravioleta empleado rutinariamente en el análisis de glucosa en el área clínica, añadiendo como ventajas en el análisis individual de muestras, su rapidez, bajo costo por prueba, y la posibilidad de medición en sangre completa.

4.1 Caracterización

El conocimiento de la respuesta de un transductor es de suma importancia, porque de sus características depende el que pueda o no ser aplicado en una área de interés particular.

En el caso del electrodo enzimático para medición de glucosa, cuya área de aplicación importante se encuentra en el área clínica, en la determinación de glucosa en sangre y en el área industrial, en la medición de glucosa en alimentos, requieren mediciones con una incertidumbre del 3% en la parte clínica (máximo 7.7%) y 5% en la industrial, además de ser altamente específico y confiable (ref.30).

En el área clínica, las principales características que determinan la utilidad de un equipo, pueden agruparse en función de dos parámetros:

a) Confiabilidad

Sensibilidad

Precisión

Exactitud

Especificidad

b) Aplicabilidad

Tamaño de muestra

Tiempo de análisis

Facilidad de uso

Costo de operación

La caracterización en precisión y exactitud fueron medidos en dos etapas, una de laboratorio, en la que las

soluciones a medir son simples y consistentes en soluciones de glucosa en agua destilada; y una segunda, con soluciones complejas como lo son los sueros sanguíneos. La primera etapa, se planteó como una comprobación del principio de medición, además de evaluar posibles cambios en la electrónica usada, como lo fué el poner un segundo sistema de calefacción en la cámara de medición, por ser insuficiente el tratar de calentar solamente desde el electrodo. Y una segunda etapa de evaluación en condiciones de trabajo, que tuvo por objetivo, el determinar la factibilidad de su empleo en el área clínica en la determinación de glucosa en sangre.

Respecto al intervalo lineal, no obstante puede ser ampliado con diluciones externas, es preferible que se encuentre en el rango (0 - 400 mg/dl), por ser éste el empleado en sistemas de medición de glucosa convencionales en la parte clínica, en el cual pueden cuantificarse casos normales, bajos y altos de glucosa en sangre. Debido a esto, las soluciones empleadas en la primera etapa de evaluación, fueron preparadas en el intervalo (0-900 mg/dl), para garantizar la cobertura de esta área de interés. Los resultados obtenidos en esta caracterización, serán mostrados a continuación.

4.2 EVALUACION EN LABORATORIO.

4.2.1 Sensibilidad:

Sensibilidad es la capacidad del electrodo para detectar concentraciones pequeñas (10 mg/dl). La figura 4.1, muestra los resultados obtenidos en la medición de soluciones conocidas de glucosa entre 0 y 900 mgr/dl, pudiendo observar que mide linealmente (con una muestra de 70 ul) hasta 600 mgr/dl. Este intervalo lineal de medición, es similar al método de la glucosa deshidrogenasa utilizado rutinariamente en el laboratorio del hospital A.B.C. y es comparable a los que han sido reportados por analizadores comerciales extranjeros similares. Este intervalo lineal es adecuado, ya que puede detectar sin requerir de diluciones externas, situaciones de hipo, normo e hiperglicemia.

Para garantizar que la pérdida de linealidad observada experimentalmente en el electrodo enzimático no fuera debida al detector de peróxido de hidrógeno, se evaluó la curva de respuesta a éste; en un intervalo de concentraciones muy superior al esperado en una determinación de glucosa (del orden de 100 veces). Como se observa en la figura 4.2, el intervalo lineal del detector de peróxido, garantiza que la pérdida de linealidad observada en la medición de glucosa, no es debida al detector de peróxido; por generar una muestra de 600 mgr/dl de glucosa en el estado estacionario y en mejor de los casos (sin ninguna limitación (parte 2)), un flujo que no es superior al equivalente de la prueba más baja en la medición de peróxido (ver fig. 4.2).

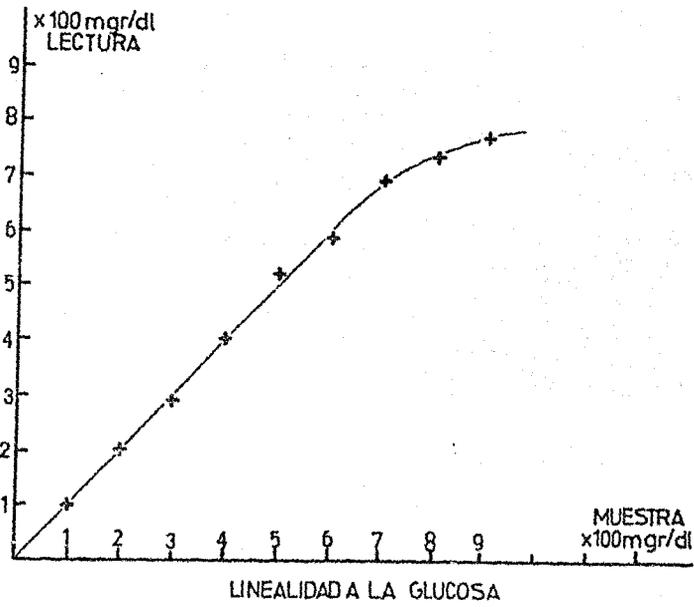


fig. 4.1

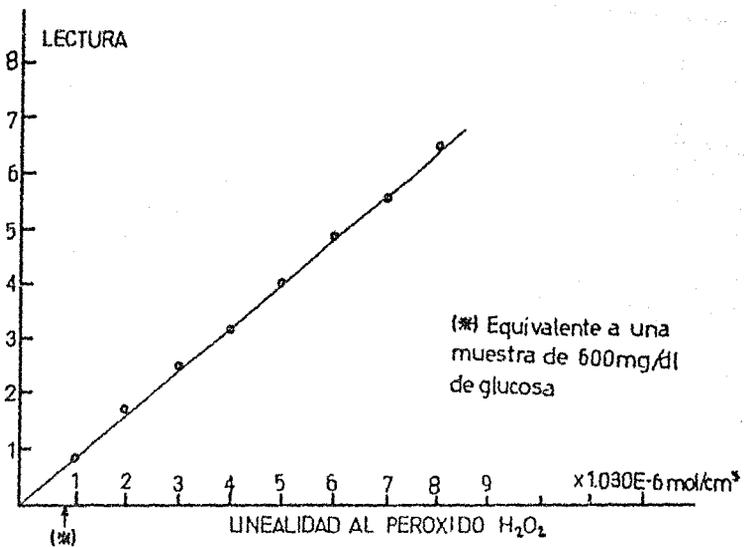


fig. 4.2

4.2.2 Reproducibilidad

La reproducibilidad es la capacidad del método a repetir una serie de resultados en iguales condiciones, valorable a través del coeficiente de variación; que en el caso de glucosa para una concentración de referencia entre 70 y 110 mgr/dl, debe ser menor al 7.7% , de acuerdo a los criterios de la Federación Internacional de Química Clínica (I.F.C.C.) (ref.30).

Para evaluar la incertidumbre en el laboratorio, fueron preparadas soluciones simples de glucosa en agua destilada, en las concentraciones (100,200,..600 mg/dl); siendo realizadas por cada muestra 10 lecturas consecutivas sin recalibración. Los datos resultantes, se muestran en la tabla 4.3, pudiéndose observar que la incertidumbre de la medición es del orden del 2%, adecuado para su uso en la parte clínica.

4.2.3 Estabilidad de la medición.

Para determinar una posible pérdida de sensibilidad de la membrana con el número de análisis, con el uso de las soluciones empleadas en el caso anterior, fué calibrada la electrónica con la solución de 300 mg/dl y realizada una serie de 70 muestras consecutivas sin recalibración (es importante hacer notar, que un aparato comercial similar de marca "YELLOW SPRING", recomienda una calibración cada 5 análisis). Los resultados se encuentran en la fig.4.4 y en ellos se nota que después de 70 lecturas, prácticamente no existe cambio en la sensibilidad de la membrana.

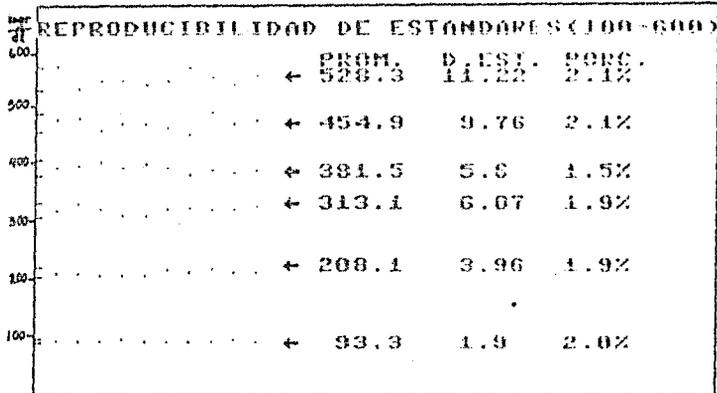


fig. 4.3

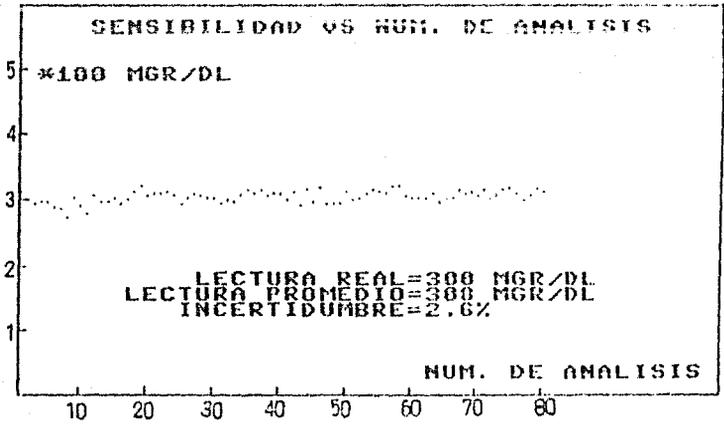


fig. 4.4

4.2.4 Tamaño de la muestra.

Como se ha mencionado antes (Cap. 2), la limitación de oxígeno es la principal causante de la pérdida de linealidad en la respuesta del electrodo, razón por la que es necesaria la dilución de la muestra.

Debido a que la cámara de medición y dilución tiene un volumen fijo (aprox 1 cm³), la única manera de cambiar la concentración en la cámara y con ella el intervalo lineal, es alterando el tamaño de la muestra.

Para obtener el tamaño de la muestra adecuado, fué tomado al principio un volumen de muestra de 100 ul (arbitrario) y realizada una gráfica de lectura del electrodo contra concentración; tomando después de esto, el valor máximo de la muestra que se encontraba aún en la parte lineal. Teniendo este valor aún en la parte lineal de la curva, fué obtenida la concentración que fuerza esta muestra en la cámara de medición y luego de esto, el volumen necesario para que 400 mg/dl forzaran una concentración igual. Con lo anterior se encontró un volumen de muestra de 70 ul, volumen con el que fué realizada la gráfica de linealidad (4.1) y en donde es cubierto en forma lineal el intervalo (0-400 mg/dl), útil en análisis clínico de glucosa en sangre.

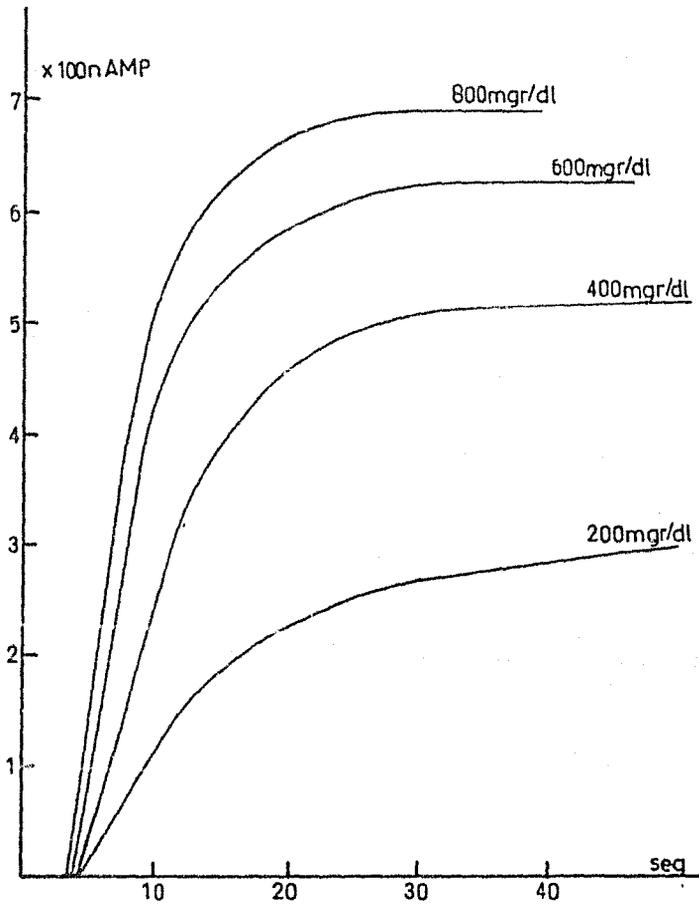
4.2.5 Tiempo de muestreo.

Como fué mencionado en el cap. 1, la lectura del electrodo es tomada y memorizada en dos momentos, la primera

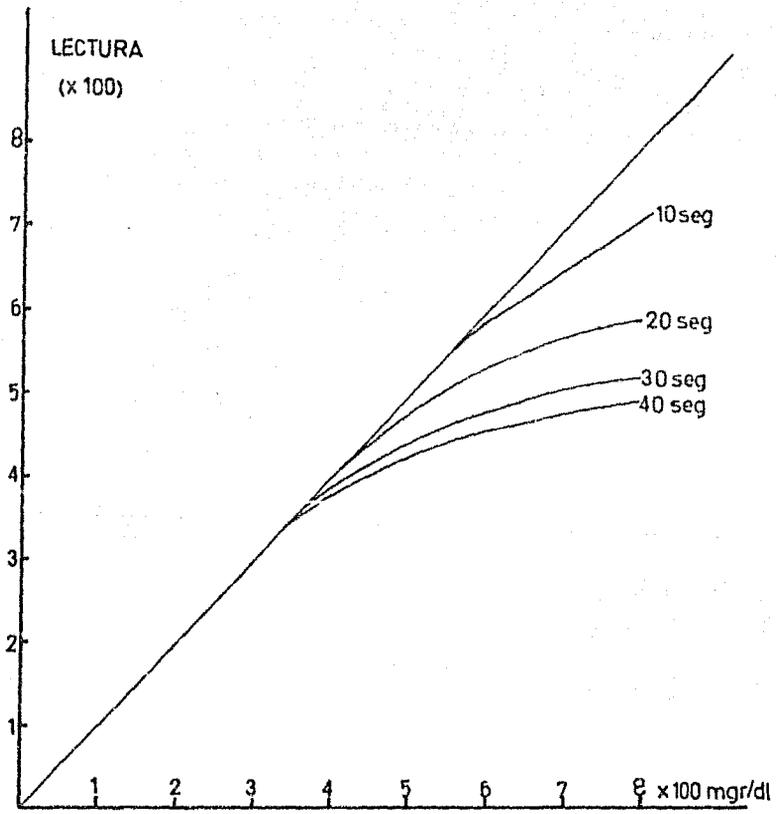
para eliminar posibles residuos de muestra anterior, así como conductividad presente en el líquido amortiguador, y una segunda un tiempo después, que es propiamente en donde es registrado el cambio debido a la liberación de peróxido de hidrógeno por la enzima, en presencia de glucosa. A la diferencia de tiempo entre estas dos lecturas es a lo que se llama tiempo de muestreo "TM".

En la figura 4.5, se presenta una gráfica de la respuesta del electrodo a diferentes muestras de glucosa; en la que puede observarse con claridad la pérdida de linealidad y el que ésta no depende solamente de la concentración de la muestra inyectada, sino también del tiempo de muestreo TM. Esto puede explicarse suponiendo que el oxígeno disuelto en las membranas, funciona como un suministro rápido de oxígeno a la zona enzimática, reduciendo el requerimiento de oxígeno en los primeros instantes de la medición (ver fig. 4.6)

Con un volumen de muestra de 70 μ l, resultó ser que un tiempo $TM=8$ seg es razonable para obtener un intervalo lineal hasta 600 mgr/dl.



RESPUESTA
DEL ELECTRODO
GLUCOSA
fig.4.5



LINEALIDAD A LA GLUCOSA
 CON EL TIEMPO DE MUESTREO

fig. 4.6

4.2.6 Tiempo de análisis.

Esta es una característica muy importante en este tipo de instrumentos, debido a la elevada demanda de análisis de glucosa en sangre; ya sea para monitoreo en caso de personas diabéticas que se medican con insulina (Turner y Pickup 1985 ref.12) o revisiones generales.

Después de las modificaciones realizadas en el intervalo lineal, el tiempo de análisis resultó ser de 40 seg. , debido a la suma de tiempos del muestreo y 40 seg. resultado del lavado de la cámara de medición (en este intervalo de tiempo es desplazado un volumen de amortiguador de pH de 20 cm³ aprox.). Este tiempo de respuesta es bastante más rápido que un modelo similar comercial de la marca "YELLOW SPRING", que solamente en la toma de la lectura tarda 60 seg y el cual presenta una incertidumbre similar a la obtenida en esta evaluación.

4.3 EVALUACION EN HOSPITAL

Esta segunda etapa de evaluación, fué realizada con la medición de glucosa en soluciones complejas, y planteada para establecer su posible empleo en análisis clínico. Los resultados obtenidos en esta etapa, serán mostrados a continuación.

4.3.1 Medición de glucosa en sangre.

Para determinar la posibilidad de su empleo en la medición de glucosa en sangre y la presencia de interferencias, fueron analizadas muestras de pacientes y

comparados los resultados con el método de absorción ultravioleta usado normalmente en el hospital para la determinación de glucosa. Este método de absorción ultravioleta, es basado en la suposición de que en un intervalo de longitud de onda centrado en 340 nm, después de una reacción enzimática, la absorción de luz de la muestra a analizar es directamente proporcional a la concentración de glucosa. Este método no está exento de interferencias en la medición, debido a la presencia de alguna sustancia con propiedades de absorción en 340 nm.

La muestra de sangre tomada al paciente, se le puede o no agregar anticoagulante dependiendo del tipo de análisis al que será sometido. Cuando en una muestra con anticoagulante es separada por centrifugado la parte de la sangre que formaría el coágulo; el resto de la solución puede ser separado por decantación y recibe el nombre de plasma sanguíneo. El suero sanguíneo, es separado de forma similar al plasma, sólo que en este caso, la muestra de sangre debe estar libre de anticoagulante.

Para separar las posibles interferencias generadas por compuestos propios de la muestra de sangre y las generadas por los anticoagulantes, se decidió en la determinación de glucosa en sangre, el empleo de suero.

4.3.2 Separación del suero en la muestra de sangre.

Para la separación del suero, la sangre del paciente sin anticoagulante, es puesta a reposar durante unos 10 min

pasando después a ser centrifugada a entre 2500-3000 RPM en un radio de giro de unos 15 cm. Después de entre 5 a 10 minutos es posible distinguir una clara diferencia entre el coágulo de color rojo depositado en el fondo y el suero de color amarillo en la parte superior. Una vez realizado lo anterior, el suero es vaciado a tubos de ensayo y está listo para su análisis.

Calibración y Control de Calidad

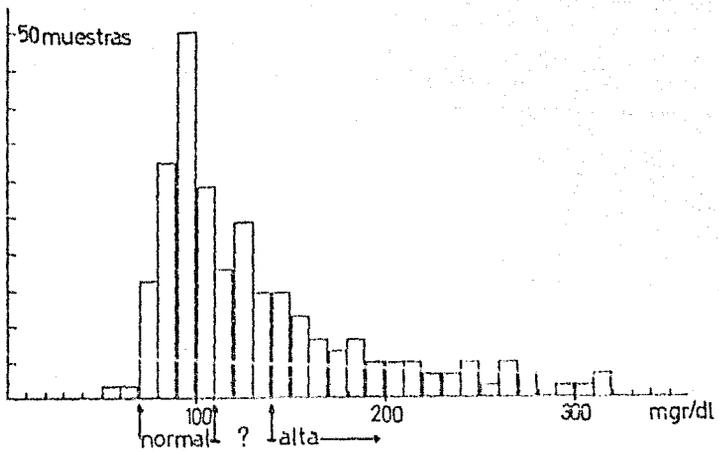
4.3.3 Calibración

Para poder establecer los valores de referencia con los que se ajustada la electrónica, es necesario el uso de soluciones calibradoras. Las características que deben tener estas soluciones son su fácil reproducibilidad, además de ser soluciones simples (como lo es glucosa en solución de agua destilada).

La distribución estadística de concentraciones de glucosa en las muestras analizadas, está representada en la fig.4.7, y en ella se muestran los intervalos de interés clínico:

Hipo glucemia	0 - 70 mg/dl
Normal	70-110 mg/dl
Indecisión	110-140 mg/dl
Hiper glucemia	>140 mg/dl

Para garantizar la representatividad de las referencias en los valores de interés, son preparadas en las concentraciones de 43 mg/dl, 150 mg/dl, 300 mg/dl.



DISTRIBUCION DE MUESTRAS ANALIZADAS

fig.4.7

4.3.4 Control de calidad

Para verificar los resultados obtenidos en condiciones de trabajo, son empleadas soluciones "Control", que son sueros humanos con concentración de glucosa medida por la fábrica e incluso con la presencia de medicamentos que pudieran alterar la medición. Estas muestras se encuentran normalmente liofilizadas para reducir su degradación y son mantenidas en refrigeración, haciendo necesario para reconstituirlos, el que les sea agregado un volumen determinado de agua destilada, quedando listos para su análisis.

En cada serie de análisis del hospital, son incluidos un par de estos controles (uno al inicio y otro al final de la serie), debiendo obtenerse los resultados indicados por el distribuidor dentro de la tolerancia permitida, para poder ser aceptados los resultados como válidos.

4.3.5 Sensibilidad.

Para realizar una experiencia equivalente a la efectuada en la medición de soluciones conocidas de glucosa en agua destilada, fueron tomados 15 muestras de sueros medidos por el hospital en el intervalo (80-200 mg/dl) y luego medidos por el electrodo enzimático. Estos resultados se encuentran en la figura 4.8, los cuales tienen un coeficiente de correlación de .95, lo que es compatible con los resultados obtenidos en la la evaluación de laboratorio.

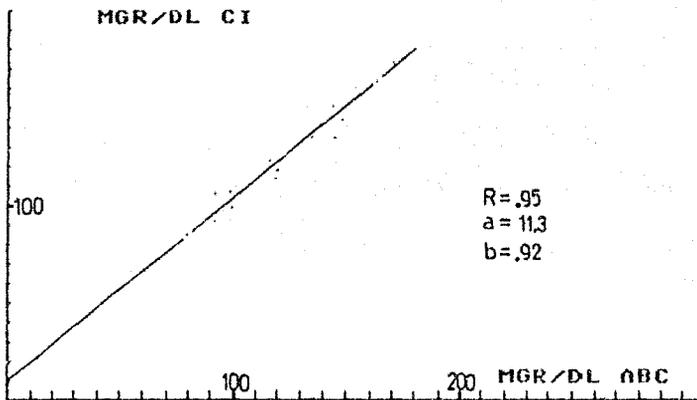


fig. 4.8

COMPARACION DE METODOS

Sueros de pacientes

Electrodo enzimatico (mg/dl)	Absorcion UV (mg/dl)
91	92
98	99
113	119
84	79
106	98
134	145
134	135
105	92
117	120
172	170
163	162
150	144
122	116
143	148

4.3.6 Precisión.

Para verificar la reproducibilidad en la lectura en soluciones sanguíneas, fueron realizadas dos series de mediciones con controles "Normal" y "Alto", datos que se muestran en la tabla 4.9. Estos valores fueron comparados con los medidos por el hospital, pudiéndose notar una alta correlación en las mediciones (100vs104 ; 254vs250), además de una incertidumbre similar a la obtenida en la medición de soluciones de glucosa en agua destilada (aprox.3%).

4.3.7 Exactitud.

Como una última prueba de la confiabilidad del método, se planteó un período de prueba de diez días a doble ciego, es decir, sin tener la posibilidad de comparar resultados hasta el final del período de prueba. Los resultados obtenidos en esta evaluación son mostrados en la figura 4.10, encontrándose un coeficiente de correlación de .96 entre ambos métodos. Este resultado puede considerarse muy bueno, por haberse obtenido en condiciones reales de trabajo; y no obstante, la correlación obtenida indica que ambos métodos de medición pueden considerarse como indistinguibles (ref 31).

DATOS DE REPRODUCIBILIDAD
CONTROL NORMAL Y ALTO

CONTROL normal (cal cada 6 mediciones)

117, 107, 106, 114, , , ,	150±165
114, 106, 107, 105, 102, 105,	150±148
114, 108, 108, 109, 110, 108,	150±149
114, 109, 114, 109, 110, 110,	150±162
109, 106, 104, 108, 103, 106,	

LECTURA=108±-3.3% Vs 104 ABC

CONTROL alto (cal cada 6 mediciones)

259, 263, , , , ,	305±312
261, 252, 255, 250, 263, 255,	305±316
258, 242, 249, 256, 247, 249,	305±309
264, 252, 259, 252, 254, 258,	305±315
254, 256, 249, 252, 250, 264,	305±318

Lectura=254±-2% Vs 250 ABC

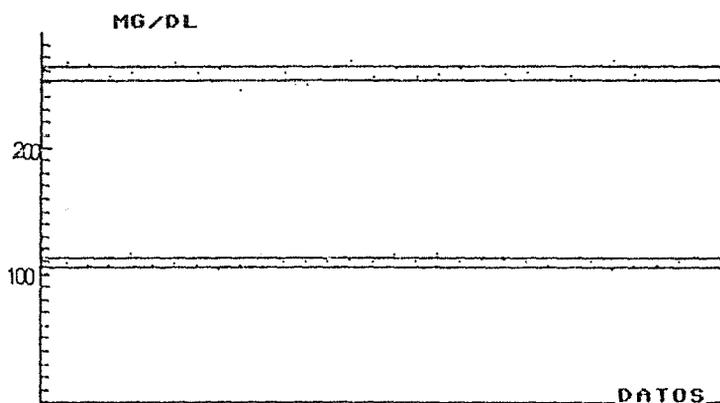


TABLA 4.9

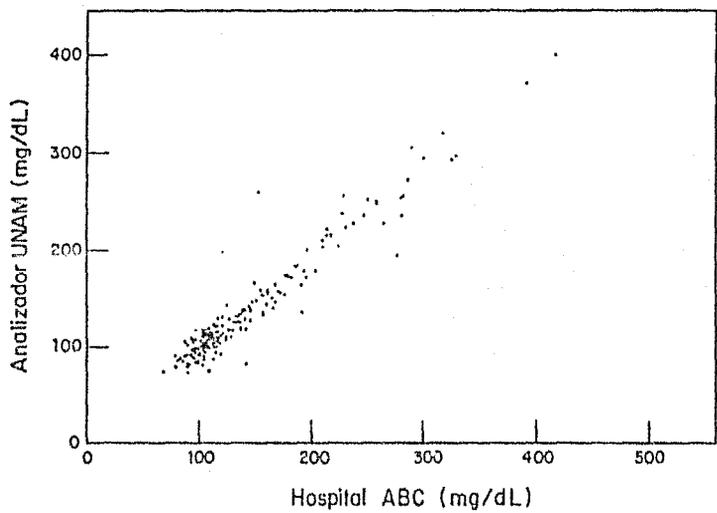


fig. 4.10

4.3.8 Especificidad

La especificidad del electrodo, se refiere a la capacidad de no ser alterada la lectura, con la presencia de otras sustancias a las que se llama "interferencias" (Mascini y Guilbault 1986 ref.14).

Los resultados antes mostrados en la comparación de los métodos, implican, por estar ambos sistemas basados en principios de medición diferentes (uno óptico y otro electroquímico), la inexistencia o la baja influencia de interferencias en las muestras analizadas; pudiéndose decir después de esta evaluación, que este electrodo puede ser empleado como un método alternativo en la medición de glucosa en suero sanguíneo, con ventajas sobre el método (UV) en el análisis de muestras individuales, como lo son su fácil manejo, rapidez de operación (8 seg. después de inyectada la muestra), bajo costo de operación (los reactivos son reutilizables al contrario del método UV; despendiciéndose sólo el líquido de lavado que es de bajo costo aprox. 10\$/análisis), insensibilidad al color o transparencia de la muestra (lo que hace factible el análisis de glucosa en sangre completa), y el que pueda cambiarse la sustancia a medir con el simple cambio de una membrana.

4.3.9 Medición de glucosa en Plasma y Sangre completa.

Para verificar la posibilidad de medición en sangre completa, así como la existencia de interferencias debidas

al anticoagulante (heparina), presente en el plasma, se continuó con una serie de diez mediciones de muestras en plasma y sangre completa, que aunque no tiene la profundidad de la evaluación en suero sanguíneo, sí da una clara idea de las posibilidades de su medición. Los resultados de esta evaluación están mostrados en la tabla 4.11, y en ellos puede observarse que la medición en plasma es prácticamente equivalente a la medición en suero (lo que concluye la no interferencia de la heparina en la medición), además de ser detectada una continua baja en la medición de sangre completa. Esta disminución en la medición de la concentración de glucosa en sangre, es sistemáticamente encontrada por otros métodos de medición, y es explicada por la presencia de los glóbulos, que al tener en su interior una concentración de glucosa inferior a la del líquido interglobular (ref.13 Cap.2.11), funciona como una dilución adicional a la muestra; esto es un inconveniente para la medición de glucosa, por que la concentración de glóbulos (medible a través de la cuenta globular) puede ser alterada, resultando un aumento de la imprecisión de la medición. Otro inconveniente de la medición en sangre completa es el deterioro de la muestra, que es mayor que en suero (del orden de un 40% en 4 horas). Sin embargo entre sus ventajas se encuentra el que no es necesario ninguna preparación de la muestra, pudiendo ser empleado como un buen método auxiliar para la cuantificación de glucosa en salas de urgencia u operación.

MEDICION EN SANGRE COMPLETA Y PLASMA

(tabla 4.11)

***** Lectura analizador *****		ABC			
Sangre completa	(78)	Plasma	(90)	Lectura ABC	(99)
Sangre completa	(41)	Plasma	(44)	Lectura ABC	(46)
Sangre completa	(64)	Plasma	(80)	Lectura ABC	(74)
Sangre completa	(51)	Plasma	(64)	Lectura ABC	(72)
Sangre completa	(122)	Plasma	(139)	Lectura ABC	(134)
Sangre completa	(93)	Plasma	(120)	Lectura ABC	(111)
Sangre completa	(107)	Plasma	(134)	Lectura ABC	(135)
Sangre completa	(39)	Plasma	(51)	Lectura ABC	(50)
Sangre completa	(110)	Plasma	(134)	Lectura ABC	(140)
Sangre completa	(30)	Plasma	(57)	Lectura ABC	(56)

C O N C L U S I O N E S

Este equipo, en función de su velocidad de análisis (10 seg.) y su tiempo de repetición (aprox 1 min), es un instrumento útil particularmente en el análisis de muestras individuales, tal como es necesario en los servicios de urgencias y terapia intensiva, siendo un complemento útil para la realización de pruebas de alto volumen. Obviamente este equipo no sustituye a los que realizan un gran número de análisis, como es el caso del análisis centrífugo.

La confiabilidad de este instrumento es muy superior a la que proporcionan las tiras reactivas, haciéndolo su aplicabilidad accesible inclusive a nivel de consultorio médico.

El analizador es un instrumento de operación extraordinariamente simple, únicamente requiere de la inyección de la muestra (sangre, plasma o suero) al aparato previamente calibrado. En consecuencia no requiere de personal calificado para su manejo y los operadores pueden ser adiestrados en cuestión de minutos.

El aparato sólo requiere como reactivos, de un amortiguador (fácilmente preparable en el laboratorio) para la dilución interna de la muestra y el lavado de la cámara, reutilizando la enzima para análisis posteriores, reduciendo con ello el costo de operación, en comparación a los métodos espectrofotométricos que sacrifican la enzima en el lavado

(aprox 10\$/análisis).

Debido a que la medición no se lleva a cabo a través de cambios de color o de absorbancias, el método es insensible a problemas de turbidez o coloración en las muestras, efectos que son problemáticos en la cuantificación por métodos espectrofotométricos (hemólisis, lipemia).

La membrana enzimática puede ser utilizada hasta por un mes o 500 pruebas sin pérdida apreciable en la sensibilidad, lo que hace que el se requiera de un mantenimiento mínimo. El cambio de membrana es fácil y requiere de sólo unos minutos.

Aún cuando no se ha evaluado el precio al que se podría introducir al mercado nacional, consideramos que será bastante más bajo que los analizadores de importación con características similares y que oscilan alrededor de \$7,500. US dls (ref 25).

En virtud de las consideraciones anteriores y de la caracterización y evaluación a nivel clínico, podemos concluir que el electrodo electroenzimático desarrollado en la UNAM para la cuantificación de la glucosa es un método confiable, comparable a los métodos enzimáticos comúnmente usados en el laboratorio clínico. Y son sus características de sensibilidad, precisión, reproducibilidad y especificidad lo suficientemente buenas como para recomendarlo como un método analítico de rutina.

```

10 REM
20 REM
30 REM
40 REM;*****
50 REM**          PROGRAMA DE SIMULACION          **
60 REM**          PARA MEDICION DE                **
70 REM**          PEROXIDO DE HIDROGENO          **
80 REM;*****
90 CLEAR
100 HRES
110 DIM A(310),B(310):REM DISTRIBUCION DE CONCENTRACIONES A T Y T+DT
120 U=          : REM GROSOR DE LA MEMBRANA CM
130 N=          : REM NUMERO DE INTERVALOS
140 @=          : REM CONSTANTE O@(.5
150 C=0         : REM INICIO DE CONTADOR DE TIEMPO
160 DP=         : REM COEFICIENTE DE DIFUSION DEL PEROXIDO
170 A=          : REM AREA TRANSVERSAL DE LA MEMBRANA
180 A(0)=       : REM CONCENTRACION INICIAL MOL/CM3
190 DT=(@*(U+2)/(N+2))/DP
200 FOR X=1 TO N1:B(X)=A(X)+ @*(A(X-1)-2*A(X)+A(X+1)):NEXT
210 W=(DP*N*A(N1-1)/U)*192969*A*1E9:REM EN NANO AMPERES
220 DOT C*DT,W
230 FOR X=1 TO N-1:A(X)=B(X):NEXT:C=C+1
240 GET G$:IF G$="T" THEN GOTO 270: REM BANDERA DE TERMINO
250 GOTO 200
260 REM GRAFICADO DE EJES CORDENADOS
270 LINE 0,0 TO 310,0:LINE 0,0 TO 0,200
280 FOR A=0 TO 310 STEP 10 :LINE A,0 TO A,4:NEXT
290 FOR A=0 TO 200 STEP 10:LINE 0,A TO 4,A:NEXT
300 REM GRAFICADO DE LAS VARIABLES
310 GPRINT AT 10,7 W "N AMP",C*DT" SEG"
320 GPRINT AT 10,8 "COEF DIF="DP" CM2/SEG"
330 GPRINT AT 10,9 "MEMBRANA="U" CM"
340 GPRINT AT 10,10"AREA="A" CM2"
350 GPRINT AT 10,11"@="@" N=10 "
360 GPRINT AT 10,12"C(0)=" A(0)"MOLES/CM3"
370 GPRINT AT 7,1"SIMULACION DE ELECTRODO H2O2"
380 GPRINT AT 32,24"X5" SEG"
390 GPRINT AT 2,3"X100 NAMP"
400 GET G$:IF G$="" THEN GOTO 400
410 IF G$="I"THEN GOTO 450: REM IMPRIMIR VARIABLES
420 IF G$="O"THEN GOTO 90: REM INICIO
430 IF G$="S" THEN TEXT: END: REM FIN
440 REM RUTINA PARA MANEJO DEL PUERTO DE LA IMPRESORA
450 OPEN 1,4
460 PRINT#1,"DP=";DP"CM2/SEG" U=";U1"CM"
470 PRINT#1,N=";N1 @=";@ " AREA=";AR"CM"
480 PRINT#1,"I=";W" N AMP" TIEMPO=";C*DT" SEG"
490 PRINT#1," "
500 CLOSE1:END

```

```

10 REM
20 REM
30 REM
40 REM*****
50 REM**          SIMULACION ETAPA 2          **
60 REM**          PARA MEDICION LINEAL DE     **
70 REM**          GLUCOSA                     **
80 REM*****
90 CLEAR:HIRE:REM MODO DE ALTA RESOLUCION
100 REM MEMORIA PARA DATOS PASO 2
110 DIMA(100),B(100),C(100),D(100)
120 REM VARIABLES DE LA SIMULACION PASO 1
130 N= :P=.4 :DG= :DP=3.2E-7:U=SE-3:A=.6
140 A(0)=5.4134E-7:REM MOLES/CMS (MUESTRA=100 MG/DL)
150 C=0:REM PASO 3
160 DT=P*((U/(2*N+1))+2)/DP
170 DX=U/(2*N+1)
180 G=DG*DT/DX+2
190 IF P>.5 THEN TEXT:PRINT"PON DT MENOR"
200 REM PASO 5
210 FOR X=1 TO N:D(X)=A(X)+G*(A(X-1)-2*A(X)+A(X+1)):NEXT
220 FOR X=N+1 TO 2*N:D(X)=C(X)+H*(C(X-1)-2*C(X)+C(X+1)):NEXT
230 C=C+1:REM PASO 6
240 A(0)=A(0)-DG*A*(2*N+1)*(A(0)-A(1))*DT/U:REM PASO 7
250 REM PASO 8
260 F1=A*(2*N+1)*DG*A(N-1)/U
270 F2=2*A*(2*N+1)*DP*(C(N)-C(N+1))/U
280 C(N)=C(N)+(F1-F2)*DT*(2*N+1)/(A*U)
290 REM PASO 9
300 FOR Y=1 TO N-1 :A(Y)=B(Y):NEXT
310 FOR Y=N+1 TO 2*N-1 :C(Y)=D(Y):NEXT
320 W=A*DP*(2*N+1)*192969*1E9*C(2*N-1)/U:REM LECTURA EN "N AMP"
330 W=W/100:REM LECTURA EN VOLTS CON R=1E7 OHMS
340 REM GRAFICADO DE LA SIMULACION PASO 10
350 GPRINT AT 10,2"TIEMPO=";C*DT" SEG "
360 GPRINT AT 10,3"C=";C
370 GPRINT AT 10,4"PER. EN ZR=";C(N)
380 GPRINT AT 10,5"PER. CERCA ELEC=";C(2*N-1)
390 GPRINT AT 10,6"PER. EN ELEC=";C(2*N)
400 GPRINT AT 10,8"LECT=";W" VOLTS "
410 GPRINT AT 10,7"C.G. EN CAMARA=";A(0)
420 GPRINT AT 10,9"ENTRADA F1=";F1
430 GPRINT AT 10,10"SALIDA F2=";F2
440 IF F1=0 GOTO 210
450 GPRINT AT 10,11" F2/F1=";F2/F1
460 DOT C*DT,W*L
470 GET G$:IF G$="+ "THEN CLEAR:L=L*10
480 IF G$="- "THEN CLEAR:L=L/10
490 IF G$="P"THEN GOTO 510:REM BANDERA DE SALIDA
500 GOTO 210
510 REM GRAFICADO DE EJES COORDENADOS
520 GPRINT AT 2,1"/";L"VOLTS"
530 GPRINT AT 35,24"* 10 SEG"
540 LINE 0,0 TO 310,0:LINE 0,0 TO 0,200
550 FOR X=1 TO 310 STEP 10:LINEX,0 TO X,3:NEXT
560 FOR Y=1 TO 200 STEP 10:LINE0,Y TO 3,Y:NEXT
570 REM RUTINA DE MANEJO DEL PUERTO DE LA IMPRESORA
580 COPY HIRE TO PRINTER
590 OPEN 1,4
600 PRINT#1,"COEFICIENTE DE DIFUSION DE PEROXIDO=";3.2E-7
610 PRINT#1,"COEFICIENTE DE DIFUSION DE GLUCOSA=";6.1E-8

```

```

10 REM
20 REM
30 REM
40 REM*****
50 REM**          SUBRUTINA ELEGIR          **
60 REM**          PARA DETERMINAR EL TIPO DE          **
70 REM**          Y OXIGENO          **
80 REM*****
90 DIM A(15), B(15), C(15), D(15), E(15), F(15):REM PASO 1
100 CLEAR: HRES=L-1:REM PASO 2
110 N=5:UF=4:K=3.2 E=7:DP=0.06E-8:DP=3.2 E=7:U=0.3:O=1.6
120 VM=3.66E-6:KM=6.8E-6:OM=3.2E-7
130 P=0*DP/K:G=U*DG/F
140 DX=U/(2*N-1)
150 DT=0*((DX)^2)/K
160 IF O>.5 THEN TEXT:PRINT"POR TI MENOR"
170 FOR X=0 TO 2*N+1:E(X)=3.2E-8:NEXT:REM CONDICION INICIAL DE OXIGENO
180 A(0)=5.4134E-7:REM MOLES/CM3 (MUESTRA=100 MG/DL)
190 C=0:REM PASO 3
200 REM PASO 4
210 FOR X=1 TO N:B(X)=A(X)+G*(A(X-1)-2*A(X)+A(X+1)):NEXT
220 FOR X=N+1 TO 2*N:D(X)=A(X)+G*(A(X-1)-2*A(X)+A(X+1)):NEXT
230 FOR X=N+1 TO 2*N:D(X)=C(X)+P*(C(X-1)-2*C(X)+C(X+1)):NEXT
240 FOR X=1 TO N:F(X)=E(X)+O*(E(X-1)-2*E(X)+E(X+1)):NEXT
250 FOR X=N+1 TO 2*N:F(X)=E(X)+O*(E(X-1)-2*E(X)+E(X+1)):NEXT
260 REM PASO 5
270 A(0)=A(0)-DG*A*(A(0)-A(1))*DT/DX
280 E(0)=E(0)-K*A*(E(0)-E(1))*DT/DX
290 E(2*N)=E(2*N)+(A*DP*C(2*N-1)/(2*DX)-A*K*(E(2*N)-E(2*N-1)))*DT/(A*DX)
300 E(2*N+1)=E(2*N)
310 F1=A*DG*(A(N-1)-A(N))/DX
320 F2=A*DG*(A(N)-A(N+1))/DX
330 F3=A*K*(E(N-1)-E(N))/DX
340 F4=A*K*(E(N)-E(N+1))/DX
350 F5=2*A*DP*(C(N)-C(N+1))/DX
360 NM=VM*A(N)*E(N)*DT/(OM*(KM+E(N))):REM PASO 6
370 NG=A(N)*A*DX
380 NO=E(N)*A*DX
390 IF NM>NG THEN GOTO 400:REM PASO 7
400 IF NM<NO THEN GOTO 450
410 REM PASO 8
420 C(N)=C(N)-F5*DT/(A*DX)+NM/(A*DX):REM LIMITACION POR DIFUSION
430 A(N)=A(N)+(F1-F2)*DT/(A*DX)-NM/(A*DX)
440 E(N)=E(N)+(F3-F4)*DT/(A*DX)-NM/(A*DX):GOTO 500
450 C(N)=C(N)-F5*DT/(A*DX)+NO/(A*DX):REM LIMITACION POR OXIGENO
460 A(N)=A(N)+(F1-F2)*DT/(A*DX)-NO/(A*DX)
470 E(N)=(F3-F4)*DT/(A*DX):GOTO 500
480 IF NM<NO THEN GOTO 500
490 C(N)=C(N)-F5*DT/(A*DX)+NG/(A*DX):REM LIM. POR VEL. DE REACCION
500 A(N)=(F1-F2)*DT/(A*DX)
510 E(N)=E(N)+(F3-F4)*DT/(A*DX)-NG/(A*DX):GOTO 560
520 IF A(N)>E(N) THEN GOTO 450
530 IF A(N)<=E(N) THEN GOTO 490
540 C=C+1:REM PASO 9
550 REM PASO 11
560 FOR Y=1 TO N-1:A(Y)=B(Y):NEXT
570 FOR Y=N+1 TO 2*N-1:A(Y)=B(Y):NEXT
580 FOR Y=N+1 TO 2*N-1:C(Y)=D(Y):NEXT
590 FOR Y=1 TO N-1:E(Y)=F(Y):NEXT

```

```

600 FOR Y=N+1 TO 2*N-1 :E(Y)=F(Y):NEXT
610 R(C*N)=A(2*N-1)+A(C*N+1)+A(C*N-1)
620 W=H*DP*19.200*10^9*(C*N-1)/DX*W*W/100
630 GPRINT AT 10,2"TIEMPO=";L*DT" SEG
640 GPRINT AT 10,3"C=";C
650 GPRINT AT 10,4"PER. EN ZR=";R(N)
660 GPRINT AT 10,5"PER. CERCA ELEC=";C(2*N-1)
670 GPRINT AT 10,6"GLUC. EN ZR=";R(N)
680 GPRINT AT 10,8"LECT=";W" VOLTS
690 GPRINT AT 10,7"C.G. EN CAMARA=";R(N)
700 GPRINT AT 10,9"ENTRADA F1=";F1
710 GPRINT AT 10,10"GLUCIDA F2=";F2
720 IF F1=0 GOTO 740
730 GPRINT AT 10,11" F2/F1=";F2/F1
740 GPRINT AT 10,12"C.OX.EN CAMARA=";E(N)
750 GPRINT AT 10,13"C.OX.EN ZR=";E(N)
760 GPRINT AT 10,14"C.OX.EN ELEC=";E(2*N-1)
770 I=310/(2*N+1)
780 DOT C*DT,W*10
790 GET G$:IF G$="" THEN CLEAR:L=L*10
800 IF G$="--" THEN CLEAR:L=L/10
810 IF G$="P" THEN GOTO 920
820 GOTO 210:REM PASO 12
830 VOLUME 15
840 FOR I=1 TO 3
850 VOICE I WAVE TRIANGLE
860 VOICE I TONE 2000*2+I
870 VOICE I ADSR 0,0,15,0 ON
880 NEXT I
890 SOUND OFF
900 GET G$:IF G$="" THEN GOTO 830
910 SOUND OFF
920 GPRINT AT 2,1"VOLTS"
930 GPRINT AT 35,24"* 10 SEG"
940 LINE 0,0 TO 310,0:LINE 0,0 TO 0,200
950 FOR X=1 TO 310 STEP 10:LINE X,0 TO X,2:NEXT
960 FOR Y=1 TO 200 STEP 10:LINE 0,Y TO 3,Y:NEXT
970 COPY HIRES TO PRINTER:END
980 OPEN 1,4
990 PRINT#1,"COEFICIENTE DE DIFUSION DE OXIGENO=";K"CM2/SEG"
1000 PRINT#1,"ACTIVIDAD ENZIMATICA MAXIMA=";VM"MOLES/SEG"
1010 PRINT#1,"CONCENTRACION (G) DE ACTIVIDAD MEDIA=";KM"MOLES/CM3"
1020 PRINT#1,"CONCENTRACION DE SATURACION PARA O2=";OM"MOLES/CM3"
1030 PRINT#1,"ACTIVIDAD ENZIMATICA FINAL=";NA/DT"MOLES/SEG"
1040 CLOSE 1

```

ANEXO 4

Algunos compuestos reportados como posibles de ser medidos mediante electrodos enzimáticos.

Alcohol	a	Acetil-colina	a
Acido acético	a	Acido ascórbico	b
Acido fórmico	a	Acido glutámico	a
Acido lactico	a	Amigdalina	a
L-Aminoácidos	a	D-Aminoácidos	a
AMP	a	L-Asparagina	a
L-Arginina	a	Acido succínico	a
Butiril tiocolina	a	Cefalosporinas	d
L-Cisteina	a	Colesterol	a
Colina	a	Creatinina	a
Fosfato	a	Fosfolípidos	c
Glucosa	a	Glutamina	a
Glutamato	a	L-Histidina	a
H ₂ O ₂	a	Lípidos neutros	d
L-Lisina	a	Maltosa	a
L-Metionina	a	Monocaminas	d
NaOH	a	Nitrato	a
Nitrito	a	Oxalato	a
Penicilina	a	Proteínas	b
Sacarosa	a	Sulfato	a
Tiosulfato	a	L-Tirosina	b
Urea	a	.	.

a) Guilbault T. 1980
c) Susuki y Karube 1981

b) Aston y Burner, 1984

REFERENCIAS

- 1.- Gordon M. Barrow : Química Física Vol II
(Reverte, 1972, España)
- 2.- Ralph H. Petrucci : Química General
(Fondo Educativo Interamericano, 1974, México)
- 3.- Enrique Villarreal D. : Fuentes Electroquímicas de Corriente
(Linusa-Wiley, 1971, México)
- 4.- F.W. Atkins : Fisicoquímica
(Fondo Educativo Interamericano, 1985, México)
- 5.- D.J. Pietrzyk C.W. Frank : Química Analítica
(Interamericana, 1983, México)
- 6.- Stanley I. Sandler : Termodinámica en la Ingeniería Química
(Interamericana, 1981, México)
- 7.- Bowman y Rand : Farmacología Bases Bioquímicas y Patológicas
(Interamericana, 1984, México)
- 8.- William Edmund M. : Numerical Solution of Differential Equations
(Dover, 1970, New York)
- 9.- Clifford D. Ferris : Introduction to Biosensors
(Plenum Press, 1977, New York)
- 10.- Albert L. Lehninger : Bioquímica
(Omega, 1985, Mexico)

- 11.- Cass A.E., Davis G., Francis G.: "Ferrocene Mediated Enzyme Electrode for Amperometric Determination of Glucose"
(Analytical Chemistry 1984, 56, 667)
- 12.- Hickling A. y Wilson W.: "The Anodic Descomposition of Hydrogen Peroxide"
(Journal of the electrochemical society Vol.98, No.11, 425-433)
- 13.- Leland C., Clark Jr. : "The Hydrogen Peroxide Sensing Platinum Anode as an Analitical Enzyme Electrode"
(Methodes in Enzymologie Vol.41, 449-479 Specialized techniques)
- 14.- Mascini M.y Guilbault G. : "Clinical Uses of Enzyme Electrode Probes"
(Biosensors 2(1986)147-172)
- 15.- Russell L.J. y Rawson K. : "The Commercialisation of Sensor Technology in Clinical Chemistry: an Outline of the Potencial Difficulties"
(Biosensors 2(1986)301-318)
- 16.- Harnold A.H. Quimica Fisiologica pag. 156-159
(Edit. El Manual Moderno 1976 México)
- 17.- Jenking G.M., Kawamura K. : "Structure of the Glassy Carbon"
(Nature Vol.231, 175. 176)
- 18.- Updike S., Shults M. y Ekman B. : "Implanting the Glucose Enzyme Electrode"
(Diabetes Care 5, (3), 207-212)

19.- Lingane J.J : "Chemical Evidence for Oxide Film on Platinum Electrometric Electrodes"

(Journal American Chemical Soc. Vol 79, 4901)

20.- Lundback H., Jonansson G. : "Determination of Hydrogen Peroxide in Dickling Bands for Copper alloys by Linear Sweep Voltametry"

(Analytical Chemical Acta, Vol. 128, 141-146)

21.- Turner A.P. y Pickup J.C. : "Diabetes Melitus: Biosensors for Research and Management"

(Biosensor 1 (1985) 85-115)

22.- Nelboeck M. Klose S. : "Economic Aspect of High Purity Enzymes as Related to Analysis"

(Appl Biochem. Bioeng 1001 3, 253.)

23.- Galindo E. : "Electrodos Biologicos"

(Ciencia y Desarrollo 1986 71, 37)

24.- Anonimo (sin fecha) : "Analizador Enzimatico de Glucosa". Folleto descriptivo UNAM

25.- Yellow Spring Instruments. "Lista de Precios 1985"

26.- Guilbault, G.G. (1980). "Enzyme Electrode Probes"

(Enzyme. Microb. Technol. 2; 258-263)

27.- Susuki, S. y Karube I. (1981) "Bicelectrochemical Sensor Based on Immobilized Enzymes, Whole Cells and Proteins"

(Appl. Biochem. Bioeng. 3:145-174)

28 Clarc L. y Lyons C. (1962): "Electrode System for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery"

(Ann. NY Acad. Sci. 29, 102)

29 Nissen H. Akerlund A. y Mosbach K. (1973): "Determination of Glucosa, Urea y Penicillin Using Enzyme pH Electrodes"

(Biochim. Biophys. Acta, 320, 590.)

30 Whitehead T. P y Swartz M. K. (1977): "Quality Control in Clinical Chemistry"

(New York: Wiley Medical Publication 1977:135)

31 Terres S. Caloca T. y Galindo F (1987): "Caracterización de un Analizador Electroenzimático de Glucosa Desarrollado en la UNAM"

(Rev. Mex. Patol. Clin. 34:4:1987)