

00550

**UNAM**  
**POSGRADO**



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

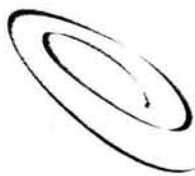
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“DETERMINACIÓN DE  
PERÓXIDO DE HIDRÓGENO  
EN MUESTRAS CLÍNICAS”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS  
P R E S E N T A:  
Q. PATRICIA DIAZ ARISTA

TUTOR: DR. JOSÉ ALEJANDRO BAEZA REYES



Ciencias  
Químicas

MEXICO, D.F.

2004

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

JURADO ASIGNADO.

PRESIDENTE	Dr. José Luz González Chávez
VOCAL	Dra. María Teresa Ramírez Silva
SECRETARIO	Dra. Adriana Morales Pérez
1 <sup>er</sup> SUPLENTE	Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero
2 <sup>do</sup> SUPLENTE	Dr. Bernardo A. Frontana Uribe

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**  
LABORATORIO DE ELECTROQUÍMICA ANALÍTICA EN  
INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA EXPERIMENTAL.  
*DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO.*  
*FACULTAD DE QUÍMICA. UNAM.*



ASESOR

Dr. José Alejandro Baeza Reyes

SUSTENTANTE  
Patricia Díaz Arista

*Este trabajo se presentó en:*

***JOINT MEETING OF THE  
WESTERN PHARMACOLOGY SOCIETY***

Celebrado del 27 de enero al 1° de febrero de 2002,  
en la ciudad de Mazatlán, México

***XIV CONGRESO DE LA  
SOCIEDAD IBEROAMERICANA DE  
ELECTROQUÍMICA***

Celebrado del 8 al 13 de septiembre de 2002,  
en la ciudad de Évora, Portugal

***XLV CONGRESO NACIONAL DE LA  
SOCIEDAD MEXICANA DE  
CIENCIAS FISIOLÓGICAS***

Celebrado del 8 al 12 de septiembre de 2002,  
en la ciudad de Colima, México

***XXV CONGRESO LATINOAMERICANO  
DE QUÍMICA***

Celebrado del 22 al 26 de septiembre de 2002,  
en la ciudad de Cancún, México

***II CONFERENCIA INTERNACIONAL  
DE QUÍMICA***

Celebrado del 3 al 6 de junio de 2003,  
en la ciudad de Santa Clara, Cuba

*y publicado en:*

***PROCEEDINGS OF THE  
WESTERN PHARMACOLOGY SOCIETY***  
Volume 45, 2002, pag. 112-113

*aprobado para su publicación en:*

**JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND  
EXPERIMENTAL THERAPEUTICS**  
Volume 307, No. 2, 2003, pag. 497-504

**WESTERN PHARMACOLOGY SOCIETY**  
**ASOCIACIÓN MEXICANA DE**  
**FARMACOLOGÍA A.C.**



CERTIFY THAT THE STUDY ENTITLED:

**ELECTROANALYTICAL DETERMINATION OF HYDROGEN PEROXIDE IN  
BIOLOGICAL LIQUID SAMPLES**

By P.Díaz-Arista, M.Lorenzana-Jiménez, H.Vidrio and A.Baeza.

WAS PRESENTED AT THE JOINT MEETING  
45th Annual Meeting of the Western Pharmacology Society  
XXV Congreso Nacional de Farmacología

**In Memoriam**  
**Dr. Thomas F. Burks**

Mazatlán, Sinaloa, México, January 27<sup>th</sup> to February 1<sup>st</sup>, 2002.

**DR. FRANCISCO J. FLORES MURRIETA**  
PRESIDENT OF THE WPS

**DR. FRANCISCO J. LARIOS MEDINA**  
PRESIDENTE DE LA AMEFAR



## XV Congresso da Sociedade Ibero-Americana de Electroquímica

8-13 de Setembro de 2002  
Évora, Portugal

### Declaração

Para os devidos efeitos informa-se que foi apresentado no SIBAE 2002 a seguinte comunicação painel:

#### DETERMINACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN MUESTRAS CLÍNICAS

Patricia Díaz-Arista, Marte Lorenzana-Jiménez, Horacio Vidrio  
y Alejandro Baeza.

*P. A.* Presidente da Comissão Organizadora

Lisboa, 08 de Setembro de 2002

# **SOCIEDAD MEXICANA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

## **XLV**

### **CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS**



**Universidad de Colima  
8-12 de septiembre de 2002**



**PAPEL DEL INTERCAMBIADOR SODIO-CALCIO EN LA RELAJACION DEL MUSCULO LISO TRAQUEAL DE COBAYO.** Herrera Mendoza P.\* (avalado por Rafael Rubio Garcia.), Espinosa Monsivais V.M.\*, Romero A.C.\* y Espinosa Tanguma R.\* Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de la UASLP, San Luis Potosí, S.L.P. México, 78210. Tel. 444-826-2345 ext. 552, FAX 444-817-6976, espinosr@uaslp.mx.

La participación funcional del intercambiador sodio-calcio (NCX) del plasmalema durante la relajación del músculo liso de las vías aéreas es controversial. En fecha reciente encontramos que la velocidad de relajación (medida como el tiempo necesario para alcanzar el 50% del total de la relajación, o  $T_{50\%}$ ) de anillos de tráquea de cobayo, previamente contraídos con Histamina, se incrementa significativamente cuando los anillos son lavados con soluciones libres de sodio ( $0\text{Na}$ ). También encontramos que las soluciones  $0\text{Na}$  potencian transitoriamente la tensión producida por la Histamina. Lo anterior sugiere que el NCX participa en la regulación de la concentración de calcio intracelular en este músculo. En el presente trabajo estudiamos con más detalle los efectos de las soluciones libres de sodio en anillos de tráquea de cobayo previamente contraídos con Histamina. Probamos el efecto de Nifedipina (un bloqueador de los canales de calcio dependientes de voltaje), Thapsigargina y Acido Ciclopiazónico (dos inhibidores de la  $\text{Ca-ATPasa}$  del retículo sarcoplásmico), Diclórobenzamil (un inhibidor no específico del NCX) y de soluciones libres de calcio. Los resultados obtenidos hasta este momento muestran que las respuestas inducidas por soluciones  $0\text{Na}$  son dependientes de calcio extracelular y bloqueadas por el Acido Ciclopiazónico. Apoyado por CONACYT 33401-N a RET.

**INFLUENCIA DE LA HIDRALAZINA Y METILAMINA SOBRE LA CONCENTRACION DE PEROXIDO DE HIDROGENO EN EL PLASMA DE RATAS.** Lorenzana-Jiménez M., Vidrio H., Díaz-Arista P.\* y Baeza A.\* Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina y Departamento de Electroquímica, Facultad de Química, UNAM, México, D.F. 04510

La hidralazina es un vasodilatador con mecanismo de acción desconocido. Inhibe varias enzimas, entre ellas a la amino oxidasa sensible a la semicarbazida (SSAO), cuyo papel fisiológico se desconoce, aunque se sabe que utiliza aminas primarias como sustrato para generar peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) entre otros productos y que abunda en el músculo liso vascular. Puesto que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  libera al prostanoide vasoconstrictor tomboxano  $\text{A}_2$ , es posible que por esta vía la SSAO esté involucrada en la regulación del tono vascular. Por otro lado, la hidralazina también se concentra en el músculo liso vascular, por lo que hemos postulado que al inhibir a la SSAO en ese tejido, se disminuye la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y por lo tanto el tono vascular. El presente estudio pretende confirmar parcialmente esta hipótesis, determinando la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en ratas pretratadas con metilamina, un sustrato de la SSAO, y con hidralazina como inhibidor de esta enzima. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  se determinó directa e indirectamente en muestras de plasma por polarografía diferencial de pulsos, utilizando un polarógrafo Metrohm 622 con un sistema de tres electrodos: uno de trabajo goteante de  $\text{Hg}^0$ , uno de alambre de  $\text{Au}^0$  como auxiliar y otro de calomel de referencia, todos acoplados a un graficador. La metilamina aumentó significativamente los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la hidralazina los disminuyó, comprobándose así la hipótesis planteada. Los resultados también sugieren que la medición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede constituir un método sencillo para determinar la actividad de la SSAO.

**LA OUABAÍNA PRODUCE UNA CONTRACCIÓN BIFÁSICA DEL MUSCULO LISO TRAQUEAL DE COBAYO: PAPEL DE LOS RECEPTORES  $\beta$ .** Navarro Huerta M.P.\*, Valle Aguilera J.R.\*, Sánchez-Armass S. y Espinosa Tanguma R.\* Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UASLP, San Luis Potosí, S.L.P. México, 78210. Tel. 444-826-2345 ext. 552, FAX 444-817-6976, espinosr@uaslp.mx.

La ouabaina es un digitalico cardíaco con efectos inotrópicos positivos. En el músculo liso traqueal de cobayo la ouabaina ( $10^{-4}$  M) produce una contracción bifásica en los primeros 60 min después de su administración. La contracción bifásica está formada por dos contracciones transitorias: la primera siempre es de mayor magnitud pero de menor duración que la segunda. Ambas contracciones son dependientes de calcio extracelular y de la activación de canales de calcio dependientes de voltaje, parcialmente dependientes de la liberación de acetilcolina por las terminales nerviosas colinérgicas y del intercambiador sodio-calcio. Sin embargo, no se conoce el o los mecanismos involucrados en el proceso de relajación. En el presente trabajo estudiamos el efecto del propranolol ( $10^{-5}$  M, antagonista de los receptores  $\beta$ ) y de la *no-nitro-l-arginina metil ester* ( $10^{-3}$  M) durante la contracción bifásica inducida por la ouabaina en anillos de tráquea de cobayo. Los resultados indican que la *no-nitro-l-arginina metil ester* no modifica la respuesta contractil de la ouabaina. Sin embargo, el propranolol inhibió en un 77 % la relajación observada en la contracción inducida por ouabaina. De tal manera que se fusionan las dos contracciones referidas. Concluimos que la ouabaina además de estimular la liberación de acetilcolina también induce la liberación de noradrenalina la cual, al actuar sobre receptores  $\beta$ , favorece la relajación del músculo liso traqueal de cobayo. Apoyado por CONACYT 33401-N a RET.

**ATEROTROMBOSIS E INHIBICIÓN DE LA FIBRINOLISIS POR LIPOPROTEÍNA(a).** De la Peña Díaz A.<sup>1</sup> (avalado por Fernández Guardiola Augusto), Izaguirre Avila R.<sup>1</sup>, Cardoso Saldaña G.<sup>1</sup>, Zamora Gonzalez J.<sup>1</sup>, Bannagarmentera F.<sup>2</sup> y Anglés-Cano E.<sup>2</sup> 1 Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" 2 Instituto Nacional de Neurología, México, D.F. 3 INSERM U 460, Paris, Francia.

La enfermedad aterotrombótica, es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los países occidentales. Factores tanto genéticos como ambientales dan origen a la aterosclerosis y a ellos debe sumarse la lipoproteína (a). La presencia de una LDL en su estructura, se asocia al desarrollo de aterosclerosis y la presencia de la apolipoproteína (a) con una inhibición competitiva del plasminógeno para generar plasmina, favoreciendo la trombosis. Por estos motivos se considera a la Lp(a) el punto común entre la aterosclerosis y la trombosis.

La gran heterogeneidad estructural de la molécula de apo(a) se traduce en una heterogeneidad funcional como inhibidor competitivo del plasminógeno por lo que es importante resaltar que existen diferencias en la concentración y en la presencia de distintas isoformas en poblaciones genéticamente diferentes y las diferencias se encuentran no sólo entre individuos sino entre poblaciones. Este trabajo propone una nueva estrategia para explorar la capacidad trombotogénica de la Lp(a) a través del estudio funcional de la unión de la apo(a) a la fibrina como indicador de la asociación de la Lp(a) al proceso aterotrombótico.

Con esta finalidad se estudiaron un grupo de enfermos con manifestaciones aterotrombóticas: 105 con enfermedad arterial coronaria (unión a la fibrina =  $0.155 \pm 0.12$  nM apo(a)) y 52 con enfermedad vascular cerebral (unión a la fibrina =  $0.268 \pm 0.15$  nM apo(a)). Los resultados se compararon con los de 91 controles y confirman que existe una asociación entre la unión de Lp(a) a la fibrina y la enfermedad aterotrombótica.

LA FEDERACION LATINOAMERICANA DE ASOCIACIONES QUIMICAS



y la

SOCIEDAD QUIMICA DE MEXICO, A. C.



Extienden la presente

## Constancia

A los autores: Q. PATRICIA DIAZ ARISTA, DR. ALEJANDRO BAEZA, DR. MARTE LORENZANA, DR. HORACIO VIDRIO

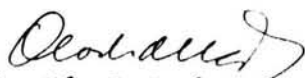
del trabajo intitulado: DETERMINACION DE PEROXIDO DE HIDROGENO EN MUESTRAS CLINICAS

que presentaron en el marco de las actividades científicas del

### XXV Congreso Latinoamericano de Química

celebrado en Cancún, Quintana Roo, México

Septiembre 22 - 26, 2002.

  
M. Sc. Olga R. Lock Sing  
Presidenta - FLAQ

  
M. en C. Jaime Noriega Bermechea  
Presidente Nacional - SQM



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

II CONFERENCIA INTERNACIONAL DE QUÍMICA / II INTERNATIONAL MEETING ON CHEMISTRY

OTORGA EL:

CERTIFICADO / CERTIFICATE

A: Patricia Díaz, Marte Lorenzana, Alejandro Baeza

Por haber presentado el trabajo titulado/ For present work entitle:


Polarografía diferencial de pulsos de  $H_2O_2$  en sangre  
para estudios farmacológicos de estrés metabólico.

Conferencia Plenaria / Plenary Lecture

Ponencias / Oral Presentation

Póster

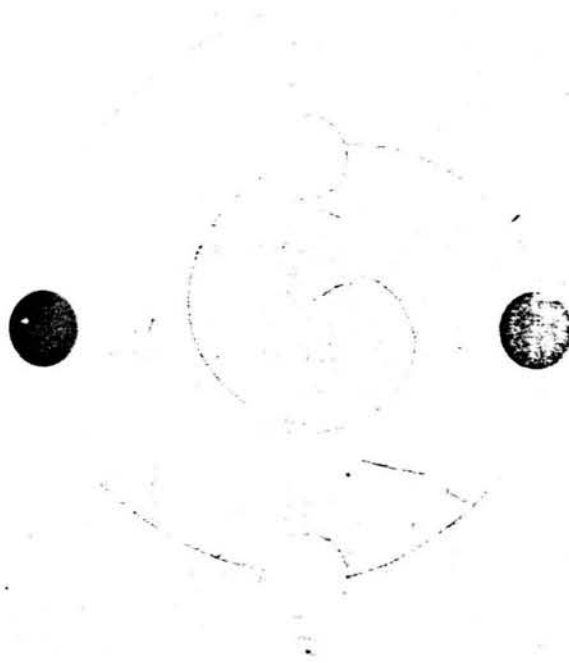
Dado en Santa Clara, Cuba a los 6 días del Mes de Junio del 2003.

  
Dra. Xiomara Cabrera Bermúdez  
Presidente de la Comisión Organizadora



PROCEEDINGS OF THE

***Western Pharmacology  
Society***



Kari Pippol: Global flow of information between disciplines accelerates progress

VOLUME 45, 2002

## Electroanalytical Determination of Hydrogen Peroxide in Liquid Biological Samples

PATRICIA DIAZ-ARISTA<sup>1</sup>, MARTE LORENZANA-JIMENEZ\*<sup>2</sup>, HORACIO VIDRIO<sup>2</sup> & ALEJANDRO BAEZA<sup>1</sup><sup>1</sup>Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, UNAM;<sup>2</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina UNAM, A.P. 70-343, Ciudad Universitaria, México DF CP 04510, D.F., Coyoacán  
\*martej@servidor.unam.mx

Determination of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) in higher animals has achieved great importance as this product indicates toxic tissue damage due to external factors, particularly oxidative stress. In addition, it is associated with the biological action of some drugs, and with physiological and pathological conditions such as exercise, arterial hypertension and heart failure [1]. Current spectrophotometric and HPLC methods of  $H_2O_2$  analysis are indirect and require time-consuming chemical sample preparation that often leads to degradation of  $H_2O_2$  [2,3]. In contrast, electrochemical measurements require little if any sample preparation, and appear to be more suitable for  $H_2O_2$  determinations, even *in situ* [4]. The aim of this work is to determine  $H_2O_2$  in normal plasma directly by differential pulse polarography (DPP), as well as indirectly detecting the oxygen produced by the addition of catalase.

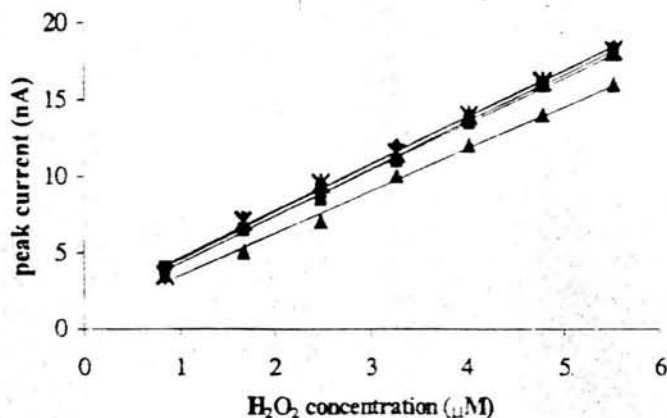


Figure 1. Calibration plots for the direct determination of  $H_2O_2$  in the presence of several matrix samples. Linear correlation parameters are: ♦ Tris buffer  $b=1.567 \pm 0.11$ ,  $m=3.08 \pm 0.09$ ,  $r^2 = 0.9975$ ; ■ plasma  $b=1.298 \pm 0.10$ ,  $m=3.03 \pm 0.13$ ,  $r^2 = 0.9985$ ; ▲ serum  $b=2.778 \pm 0.15$ ,  $m=0.69 \pm 0.13$ ,  $r^2 = 0.9945$ ; ● plasma-methanol  $b=3.090 \pm 0.07$ ,  $m=1.21 \pm 0.11$ ,  $r^2 = 0.9967$ ; \* plasma-ketone  $b=3.092 \pm 0.09$ ,  $m=1.46 \pm 0.14$ ,  $r^2 = 0.9958$ .

**METHODS:** A Metrohm 622 Polarograph was used combined with a 663VA Stand with a mercury dropping electrode (DME). A polished gold foil and a saturated calomel electrode (SCE) were used as auxiliary and reference electrode respectively. All assays were performed in 0.1 M Tris buffer solution (TBS), pH 8.0. Differential pulse polarograms were obtained scanning potential at  $v = 10$  mV/s, applying a potential pulse of  $\Delta E=50$  mV. Dropping time was 1 s.

Calibration plots, current as a function of concentration,  $\Delta I = f([H_2O_2])$ , for direct determination were performed with standard solutions of  $H_2O_2$  (Merck) in the range of 1 to 10  $\mu M$  in TBS. Nitrogen bubbling was employed to remove ambient oxygen in TBS. Indirect determination was performed mixing  $H_2O_2$  standard solutions with an appropriate amount of catalase during ten minutes. The oxygen produced was detected by electrochemical reduction with DME without nitrogen bubbling. Determinations were made in untreated plasma and in samples treated previously with several protein precipitant agents (ketone or methanol) to obtain samples free of them.

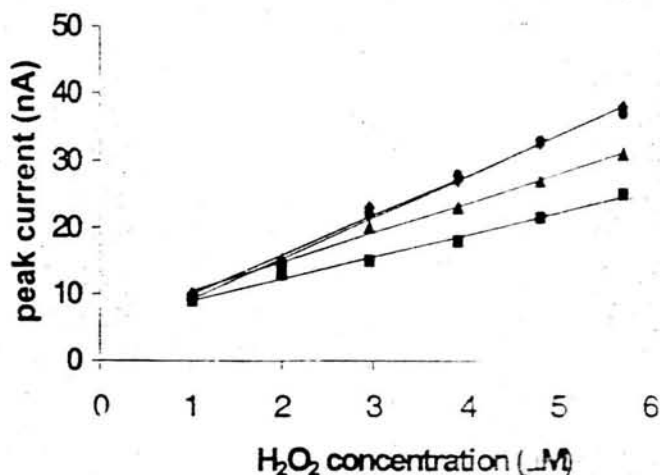
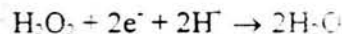


Figure 2. Calibration plots for the indirect determination of  $H_2O_2$  in the presence of several matrix samples. Linear correlation parameters are: ♦ Tris buffer  $b=6.95 \pm 0.15$ ,  $m=5.96 \pm 0.16$ ,  $r^2 = 0.9950$ ; ■ plasma  $b=7.08 \pm 0.17$ ,  $m=6.12 \pm 0.12$ ,  $r^2 = 0.9936$ ; ● plasma-methanol  $b=5.70 \pm 0.17$ ,  $m=3.29 \pm 0.18$ ,  $r^2 = 0.9926$ ; ▲ plasma-ketone  $b=6.11 \pm 0.14$ ,  $m=4.37 \pm 0.17$ ,  $r^2 = 0.9958$ .

**RESULTS AND DISCUSSION:**  $H_2O_2$  is detected by direct electroreduction in TBS due to the reaction:



A current peak is observed at  $-0.92V$  (vs SCE). A calibration plot  $I_p = (2.90 \pm 0.12)[H_2O_2] - (0.35 \pm 0.08)$ ,  $r^2 = 0.9965$  ( $n=6$ ) is obtained. Indirect  $H_2O_2$  determination yields a calibration plot  $I_p = (9.96 \pm 0.17)[H_2O_2] - (2.37 \pm 0.26)$ ,  $r^2 = 0.9919$  ( $n=6$ ). The range of linearity found was 1-10  $\mu M$  for the direct method and 1-7  $\mu M$  for the indirect one. In order to show the matrix effect on the measurement, serum, plasma, plasma-methanol and plasma-ketone samples were explored. Figure 1 shows the calibration plots for the direct method obtained mix

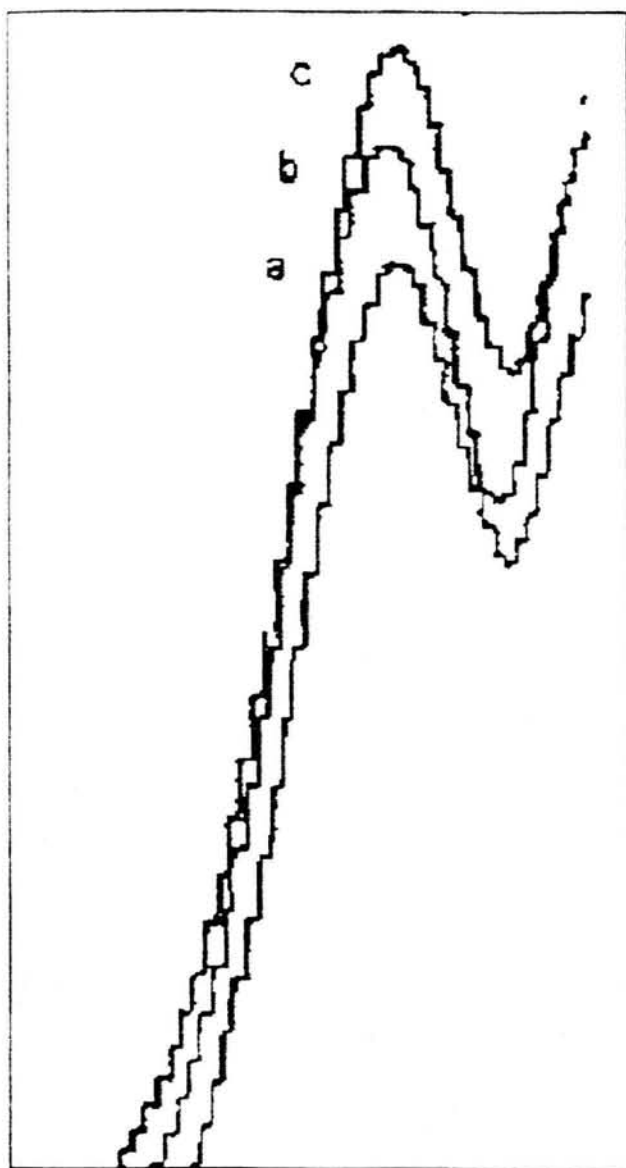


Figure 3. Typical polarographic reduction peaks for indirect determination of  $H_2O_2$ . a) 500  $\mu$ L plasma sample; b) Sample + catalase and c) Sample + catalase +  $H_2O_2$  standard.

bration plots for the direct method obtained mixing each sample, TBS, catalase and azide (for further inhibition of the enzyme) and the corresponding addition of  $H_2O_2$  standard solution. The presence of matrix does not modify the linear correlation values,  $r^2$ , with respect to standard calibration plots but nitrogen bubbling produces foam due to proteins in plasma samples. A recovery of 99.87% was obtained in plasma-ketone samples by direct method. Figure 2 shows the influence of matrix for  $H_2O_2$  indirect determination. In this case nitrogen bubbling is not necessary. Linear correlation values,  $r^2$ , are not different from direct measurements. Recovery percentage in indirect method is better for plasma alone since 102.4% was found, in contrast to 74.0% for plasma-ketone samples.

Figure 3 shows a typical polarographic peak for indirect determination of  $H_2O_2$ . Concentrations of  $H_2O_2$  of  $15.25 \pm 0.85 \mu$ M ( $n=20$ ) and  $15.32 \pm 0.75 \mu$ M ( $n=20$ ) were found by the direct and indirect methods, respectively. In rats pretreated with hydralazine, which decreases  $H_2O_2$  production, concentrations were  $11.28 \pm 0.47 \mu$ M (direct) and  $10.73 \pm 0.49 \mu$ M (indirect). Conversely, pretreatment with methylamine, which increases production of  $H_2O_2$ , produced concentrations of  $23.17 \pm 1.35 \mu$ M (direct) and  $24.08 \pm 0.97 \mu$ M (indirect).

**CONCLUSION:** It was shown that DPP is suitable for determining  $H_2O_2$  directly in plasma, minimizing drastic sample pretreatment that may cause analyte degradation. The method can successfully differentiate  $H_2O_2$  concentrations in several pharmacological situations.

#### REFERENCES

1. Swei A, Lacy F, DeLano FA & Schmid-Schönbein GW. Hypertension 30, (6), 1628-1633 (1997).
2. Nahum A, Wood LD & Sznajder JJ. Free Rad Biol & Med 6: 479-484 (1989).
3. Lin J-M, Arakawa H & Yamada M. Anal Chim Acta 371: 171-176 (1998).
4. Schwake A, Ross B & Cammann K. Sensors and Actuators B 46: 242-248 (1998).

## Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase Substrates Potentiate Hydralazine Hypotension: Possible Role of Hydrogen Peroxide

HORACIO VIDRIO, MARTHA MEDINA, PILAR GONZÁLEZ-ROMO, MARTE LORENZANA-JIMÉNEZ, PATRICIA DIAZ-ARISTA, and ALEJANDRO BAEZA

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine (H.V., M.M., P.G.-R., M.L.-J.) and Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry (P.D.-A., A.B.), Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Received June 5, 2003; accepted July 29, 2003

### ABSTRACT

The relation between inhibition of semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) and vasodilation by hydralazine (HYD) was evaluated in chloralose/urethane-anesthetized rats pretreated with various substrates of the enzyme and subsequently administered a threshold hypotensive dose of the vasodilator. The SSAO substrates benzylamine, phenethylamine, and methylamine potentiate the hypotensive response to HYD. Methylamine, which was studied in greater detail because of its status as a possible endogenous SSAO substrate, does not influence the response to the reference vasodilator pinacidil; it does enhance HYD relaxation in aortic rings obtained from pretreated rats. Experiments designed to identify the product of SSAO activity responsible for potentiation by methylamine suggest involvement of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), as evidenced by

the findings that such potentiation is abolished by additional pretreatment with the  $H_2O_2$ -metabolizing enzyme catalase, and that the plasma concentration of  $H_2O_2$  is increased by methylamine and decreased by HYD. These results are interpreted as a substantiation of the relation between the known SSAO inhibitory effect of HYD and its vasodilator activity. Pretreatment with the SSAO substrates would increase production of  $H_2O_2$  in vascular smooth muscle and thus magnify the influence of this vasoconstrictor agent on vascular tone. In these conditions, the decrease in  $H_2O_2$  production and hence in vascular tone caused by SSAO inhibition by HYD would also be magnified. It is speculated that inhibition of vascular SSAO could represent a novel mechanism of vasodilation.

The mechanism of the vasodilator action of hydralazine (HYD) has been under continuous scrutiny since its introduction as an antihypertensive agent in the early 1950s, but to this date, no incontrovertible hypothesis to that effect has been forthcoming. Currently, the drug is thought to relax vascular smooth muscle by diminishing intracellular  $Ca^{2+}$  concentration through a mechanism different from that of traditional blockers of  $L$ -type  $Ca^{2+}$  channels (Orallo et al., 1991), either by opening  $K_{Ca}$ - $1.1 K^+$  channels (Bang et al., 1998) or by inhibiting  $Ca^{2+}$  release from sarcoplasmic reticulum (Eilershaw and Gurney, 2001). The main limitation of this hypothesis is that it is based on *in vitro* experiments in which, at best, high micromolar concentrations of HYD are used, whereas hypotension can be detected *in vivo* with doses yielding much lower concentrations of the drug. For example, Ogiso et al. (1985) state that a plasma concentration of 0.02  $\mu$ g/ml (100 nM) lowers blood pressure by around 20 mm Hg in the awake rat. It is argued that such *in vitro/in vivo* differences can be accounted for, considering that after systemic administration, HYD is concentrated in the vicinity of vas-

cular smooth muscle (Baker et al., 1992), although the extent of this process in relation to plasma levels is unknown.

Based on observations of potentiation of HYD hypotension by isoniazid and other hydrazine derivatives (Vidrio, 1994), we have recently postulated inhibition of semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) as a possible mechanism of HYD vasodilation (Vidrio et al., 2002). Although the physiological or pathological role of SSAO is not completely known (Callingham et al., 1995), some of the characteristics of the enzyme make this supposition tenable. HYD, like other hydrazine derivatives, is a potent irreversible inhibitor of SSAO, with an  $IC_{50}$  in the nanomolar range when tested in rat aorta (Lyles and Callingham, 1982) and rat heart (Lyles et al., 1983). The enzyme is particularly abundant in vascular smooth muscle (Lyles and Singh, 1985), where it is located in the plasmalemma (Wibo et al., 1980). Such distribution would favor interaction with HYD, which is bound to extracellular protein in cultured vascular smooth muscle cells (Baker et al., 1992). Despite its vascular localization, involvement of SSAO in vascular function is not clear. One of the products of enzymatic activity is hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) (Callingham et al., 1995), and we have postulated that it is through this agent that SSAO could influence vascular tone

Article, publication date, and citation information can be found at <http://jpet.aspetjournals.org>.  
DOI: 10.1124/jpet.103.055350.

(Vidrio et al., 2002). The ability of  $H_2O_2$  to contract vascular smooth muscle has been documented in isolated preparations such as rat pulmonary artery (Jin and Rhoades, 1997), rat aorta (Rodríguez-Martínez et al., 1998), and human umbilical artery (Okatani et al., 1997). Multiple mechanisms appear to be involved in this effect (Yang et al., 1998; Shen et al., 2000). It is therefore conceivable that  $H_2O_2$  formed in blood vessels by SSAO could contribute to vascular tone in these structures and that a decrease in product generation by in situ inhibition of the enzyme by HYD could reduce this tone, thereby producing hypotension.

The viability of this hypothesis was assessed in the present work by exploring the influence of pretreatment with various SSAO substrates, particularly methylamine (Lyles, 1995), on HYD hypotension in anesthetized rats. It was reasoned that increased availability of substrate would enhance production of  $H_2O_2$  by SSAO, thereby increasing the proportion of vascular tone due to this agent. In these circumstances, a decrease in  $H_2O_2$  production by HYD through SSAO inhibition would lead to a greater fall in pressure. Involvement of  $H_2O_2$  in this potentiation was assessed by the use of the  $H_2O_2$ -metabolizing enzyme catalase as well as by determining the influence of SSAO substrate and HYD on plasma concentration of this analyte. Enhancement of HYD action by pretreatment with an SSAO substrate was also explored in vitro in rat aortic rings.

Of the three SSAO substrates tested, benzylamine, phenethylamine, and methylamine, emphasis was placed on the last agent. Although methylamine shows the lowest affinity for SSAO (Lyles, 1995), it is not a substrate for monoamine oxidase (MAO), as benzylamine and specially phenethylamine are (Blaschko, 1952), thus making interpretation of results more straightforward. In addition, methylamine is a naturally occurring compound and is thought to be the endogenous substrate for SSAO (Lyles, 1995).

## Materials and Methods

**Animals.** Studies were carried out in male Wistar rats weighing between 200 and 300 g, bred in the animal facilities of the Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México. They were subjected to a 12-h light/dark cycle and were maintained at 21–23°C; tap water and food pellets (5001 Rodent Laboratory Chow; Agribrands Purina Canada, Woodstock, ON, Canada) were available freely. Animals were brought daily to the laboratory for the experiments, which were conducted according to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Institutes of Health Publication 85-23, revised 1996).

**Experiments in Anesthetized Rats.** Animals were anesthetized with a mixture of chloralose, 50 mg/kg, and urethane, 800 mg/kg, administered i.p. Cannulas were placed in the trachea to facilitate spontaneous breathing, in a femoral artery for blood pressure recording, and in a femoral vein for drug administration. The arterial cannula was filled with heparin, 50 U/ml, to prevent clotting; no anticoagulant was administered systemically. Blood pressure was recorded on a Grass model 79 polygraph with a Gould-Statham P231D transducer (Grass Instrument Division, Astro-Med, West Warwick, RI). High frequencies of the transducer signal were electronically filtered to obtain a smooth tracing approximately equivalent to mean blood pressure. Heart rate was simultaneously recorded on another channel of the polygraph with a Grass 7P4 cardiograph triggered by the pulse waves from the unfiltered transducer signal. Rectal temperature of the rats was maintained between 36.8° and 37°C with a Barnant temperature controller (Barnant Co., Bar-

lington, IL). After a stabilization period of at least 20 min, the test agents HYD or pinacidil were injected i.v. as a bolus, and recordings were continued for 60 min thereafter; pressure and heart rate values were tabulated at 10-min intervals. All experimental groups consisted of six rats.

Responses to HYD, 0.1 mg/kg, were obtained in control unpretreated groups and in groups pretreated with benzylamine, 400 mg/kg, phenethylamine, 100 mg/kg, or methylamine, 200 mg/kg, all administered i.p., 2 h before HYD. Metabolism of phenethylamine by MAO was prevented by additional pretreatment with pargyline, 30 mg/kg i.p., administered 30 min before phenethylamine. A control HYD group was run in parallel with each of these pretreatment groups; initial blood pressure values of each control group were matched as close as possible with its corresponding pretreatment group to make meaningful comparisons possible. Additional controls included a group pretreated with pargyline alone and two others, one unpretreated and one pretreated with methylamine as above, in which pinacidil, 0.2 mg/kg, was used as the test vasodilator instead of HYD. Three other sets of experiments involving methylamine pretreatment and HYD as the test vasodilator were conducted. In one experiment, metabolism of the amine was prevented with the SSAO inhibitor isoniazid, 10 mg/kg i.p., administered 30 min before methylamine. In the other two, accumulation of the methylamine metabolite  $H_2O_2$  was blocked with the  $H_2O_2$  scavenger catalase, 200,000 U/kg i.v., 15 or 60 min before HYD. Finally, the influence of the pretreatment agents methylamine and catalase by themselves on blood pressure and heart rate was determined. Recordings after methylamine were continued for 2 h, which was the pretreatment interval used for this agent.

**Experiments in Rat Aortic Rings.** Rats were anesthetized with sodium pentobarbital, 20 mg i.p. total dose, and subsequently sacrificed by cervical dislocation. The thoracic aorta was removed, and segments 0.5 cm long were obtained and suspended in a jacketed 20-ml organ chamber between two nickel/chromium wire hooks. One of the hooks was fastened to the bottom of the chamber and the other was attached to a Grass FT03 force transducer, which was connected in turn to a Grass model 79 polygraph (Grass Instrument Division). The baths contained Krebs-Henseleit solution of the following composition: 119 mM NaCl; 4.7 mM KCl; 1.1 mM  $MgSO_4$ ; 1.2 mM  $KH_2PO_4$ ; 2.5 mM  $CaCl_2$ ; 25 mM  $NaHCO_3$ ; 11 mM glucose; 0.02 mM EDTA; 0.6 mM ascorbic acid. The solution was kept at 37°C and was bubbled with a mixture of 95%  $O_2$  and 5%  $CO_2$ . The preparations were subjected to a resting tension of 2g, which was maintained constant throughout the experiments. After a stabilization period of at least 90 min during which the preparations were stimulated several times with 30 nM norepinephrine, integrity of the vascular endothelium was assessed by verifying that the contracted rings relaxed by at least 50% when challenged with 1  $\mu M$  acetylcholine. Endothelium was removed in some rings by rubbing intraluminally with a 20-gauge hypodermic needle; in these preparations, absence of the endothelium was confirmed by a less than 10% relaxation upon acetylcholine challenge.

All rings were contracted with 30 nM norepinephrine and when responses induced by this agonist reached a plateau, cumulative concentration-response curves to HYD (3  $\mu M$  to 1 mM) or pinacidil (300 nM to 100  $\mu M$ ) were constructed in groups of eight or nine rings with or without endothelium. Some preparations were obtained from control unpretreated rats and others from animals pretreated 15 h before sacrifice with methylamine, 400 mg/kg i.p. For comparison, blood pressure and heart rate responses to HYD, 0.1 mg/kg, were determined in anesthetized rats subjected to this pretreatment schedule.

**Determination of  $H_2O_2$  in Plasma.** Rats were anesthetized with chloralose/urethane as described above, and blood was obtained by cardiac puncture. Groups of 12 animals received either no pretreatment, methylamine, 200 mg/kg i.p. 2 h before anesthesia, HYD, 0.1 mg/kg, or catalase, 200,000 U/kg, the latter two agents injected in the penile vein while under anesthesia, 15 min before cardiac punc-



ture. A combination of methylamine and HYD, at the doses and intervals noted, was also tested. Of the blood obtained from each rat, two 1-ml aliquots were deposited in conical polypropylene centrifuge tubes containing 100  $\mu$ l of heparin, 100 U/ml; the tubes were maintained over ice. To one of the tubes of each pair, 1.5 ml of acetone was added to precipitate proteins; these tubes were used for direct determination of  $H_2O_2$  (see below). All tubes were centrifuged at 6000 rpm for 30 min. A 500- $\mu$ l aliquot of plasma or plasma/acetone mixture was deposited in an electrolysis cell containing 2 ml of 0.1 Tris buffer, pH 7.8, from which dissolved  $O_2$  had been previously removed by bubbling with  $N_2$  for 10 min. Determinations were carried out by differential pulse polarography as described previously (Diaz-Arista et al., 2002) using a Metrohm 622 polarograph with an integrated recorder (Metrohm Ltd, Herisau, Switzerland). The analyte was determined directly in the plasma/acetone samples and indirectly by treating the plasma samples without acetone with 50  $\mu$ l of catalase, 20,000 U/ml, and measuring the  $O_2$  thus released from the  $H_2O_2$  contained in the sample. For each analytical run, calibration curves were constructed with dilutions of a standard solution of  $H_2O_2$ , in which the actual concentration of the analyte was determined by normalization with  $KMnO_4$  in  $H_2SO_4$  and oxalic acid. In the case of curves for indirect determinations,  $O_2$  was released by mixing for 10 min with appropriate amounts of catalase.

**Drugs and Chemicals.** The hydrochlorides of benzylamine, methylamine,  $\beta$ -phenylethylamine, pargyline, ( $\pm$ )-norepinephrine, and HYD, as well as heparin sodium, acetylcholine chloride, isoniazid, chloralose, and urethane were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Pinacidil was purchased from Sigma/RBI (Natick, MA). Doses refer to the salts where applicable. All other chemicals were reagent grade.

For in vivo experiments, drugs were dissolved in 0.9% NaCl solution, aided in the case of pinacidil by a drop of 0.1 N HCl; the volume of injection was 1 ml/kg. For in vitro work, stock solutions of HYD (100 mM), acetylcholine (1 mM), and pinacidil (10 mM) were prepared daily in Krebs-Henseleit solution, in the case of pinacidil with the addition of HCl. Norepinephrine (1 mM) was dissolved in 0.1% ascorbic acid. In all cases, appropriate dilutions from these stock solutions were made with Krebs.

**Data Presentation and Statistical Analysis.** Results are presented as means  $\pm$  S.E.M. Mean blood pressure and heart rate are depicted in mm Hg and beats/min, respectively; aortic ring relaxation is reported as percentage of inhibition of norepinephrine contraction, and  $H_2O_2$  plasma content as micromolar concentration. Pressure and heart rate values at each 10-min tabulation period of pretreated rats were compared with the corresponding controls by unpaired *t* tests or one-way analysis of variance followed by Dunnett's test for single or multiple comparisons, respectively. In cases of nonhomogeneous variances among groups, the nonparametric Mann-Whitney or Kruskal-Wallis procedures were used. Relaxation of aortic rings at each drug concentration as well as plasma  $H_2O_2$  in the pretreated and control groups were also compared by these tests. In the experiments with methylamine and catalase alone, all post-drug values were compared with time 0 figures by repeated-measures analysis of variance and Dunnett's test. In all cases, a probability level of less than 0.05 was accepted as significant. The aortic ring results were additionally evaluated by subjecting individual concentration-response curves to nonlinear regression analysis to calculate the negative logarithm of the  $EC_{50}$  ( $pEC_{50}$ ). Statistical procedures and regression analyses were carried out with a GraphPad Prism 3.0 package (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

## Results

**Experiments in Anesthetized Rats.** In control untreated animals, the test dose of HYD decreased mean blood pressure by not more than 15 mm Hg (Figs. 1, 2, 3, and 6). Maximum effects tended to occur 10 min after administration, with a slow subsequent recovery evident in some groups. The accompanying changes in heart rate were minimal. This pattern of response was unchanged after pretreatment with pargyline alone (Fig. 1B). Pressure responses to this same dose of HYD were considerably enhanced at practically all observation times, after pretreatment with benzylamine (Fig. 1A), phenethylamine (Fig. 1B), or methylamine (Fig. 2A); in contrast, the effect of the reference

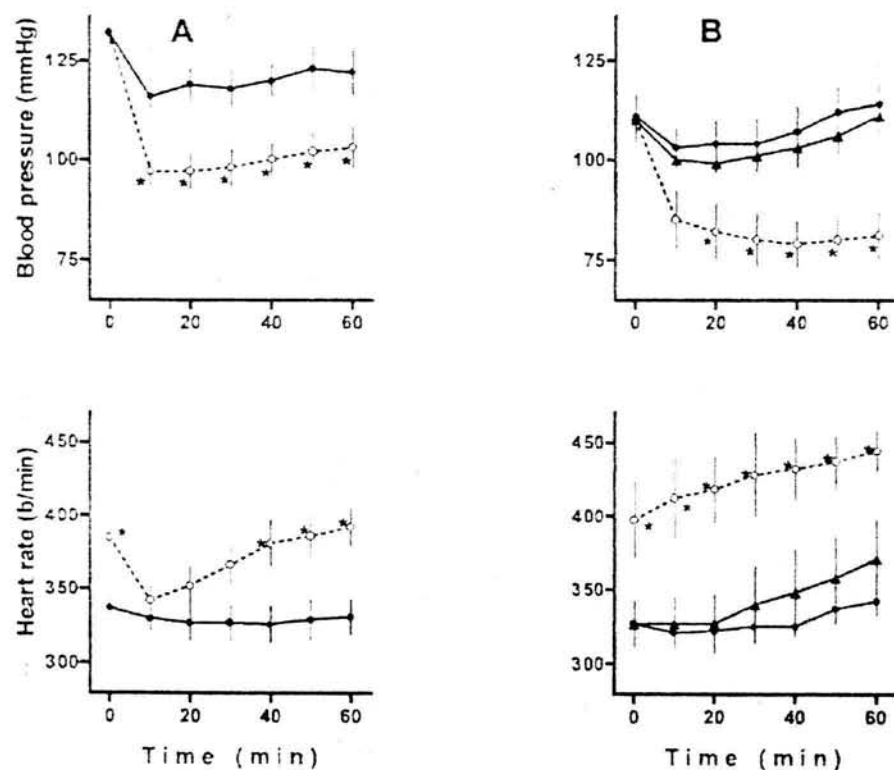


Fig. 1. Mean blood pressure and heart rate after administration of HYD, 0.1 mg/kg i.v. to control rats (solid circles) or to rats pretreated 2 h previously (open circles) with benzylamine, 400 mg/kg i.p. (A) or phenethylamine, 100 mg/kg i.p. (B). Animals in panel B also received pargyline, 30 mg/kg i.p., 30 min before phenethylamine; an additional group received pargyline alone (solid triangles). Symbols correspond to means of six animals; vertical lines are S.E.M. Asterisks indicate significant differences from control. Abscissae denote time in minutes after HYD injection; ordinates, blood pressure and heart rate in mm Hg and beats/min, respectively.

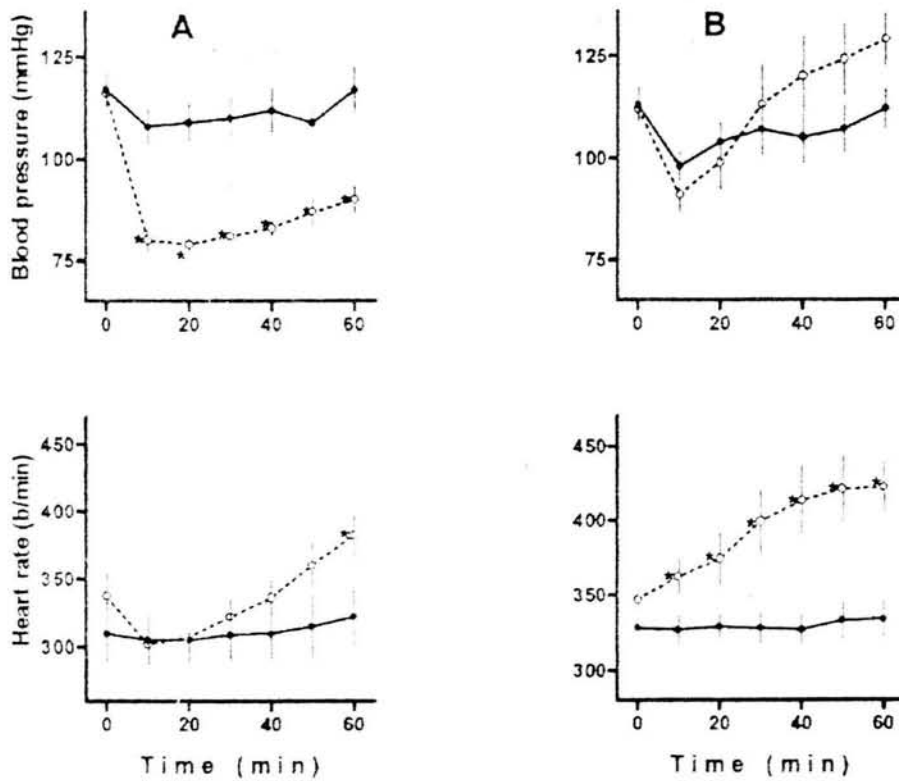


Fig. 2. Mean blood pressure and heart rate after administration of HYD, 0.1 mg/kg i.v. (A) or pinacidil, 0.2 mg/kg i.v. (B) to control rats (solid circles) or to rats pretreated 2 h previously with methylamine, 200 mg/kg i.p. (open circles). Symbols correspond to means of six animals; vertical lines are S.E.M. Asterisks indicate significant differences from control. Abscissae denote time in minutes after vasodilator injection; ordinates, blood pressure and heart rate in mm Hg and beats/min, respectively.

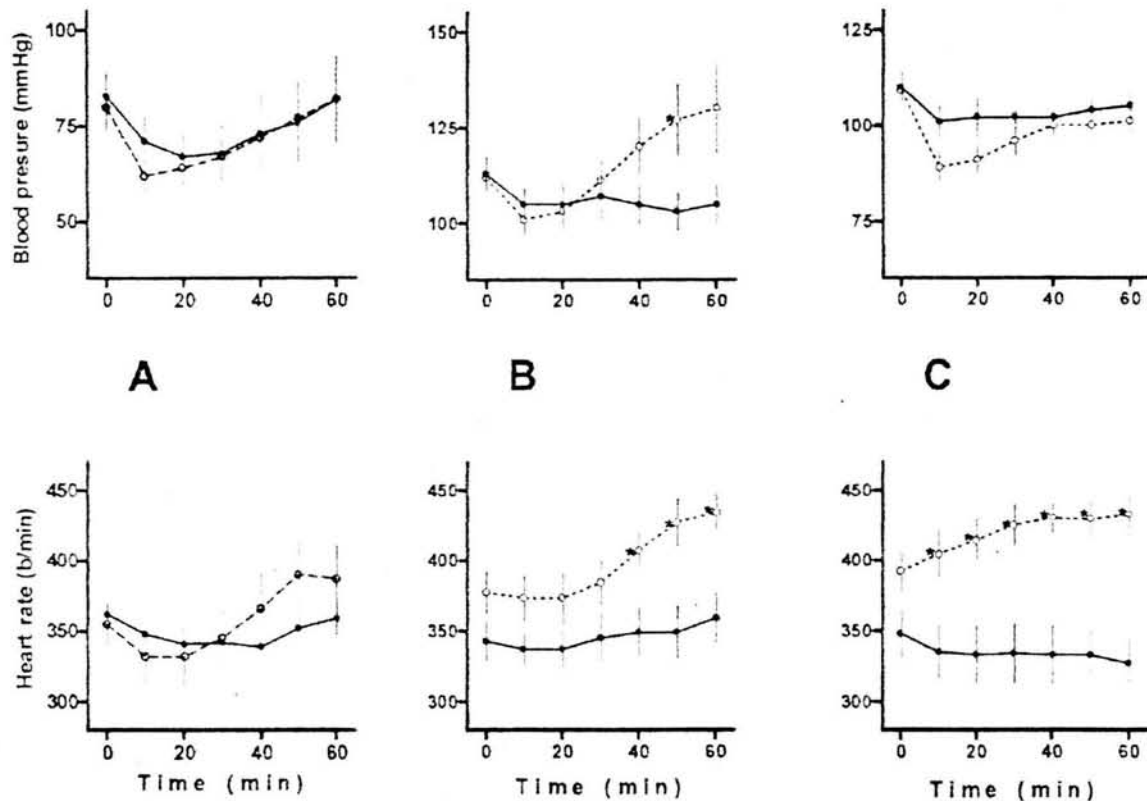


Fig. 3. Mean blood pressure and heart rate after administration of HYD, 0.1 mg/kg i.v. to control rats (solid circles) or to rats pretreated with methylamine, 200 mg/kg i.p. 2 h previously (open circles). In addition, animals received isoniazid, 10 mg/kg i.p. 30 min before methylamine (A) or catalase, 200,000 U/kg i.v., either 15 min (B) or 60 min (C) before HYD. Symbols correspond to means of six animals; vertical lines are S.E.M. Asterisks indicate significant differences from control. Abscissae denote time in minutes after HYD injection; ordinates, blood pressure and heart rate in mm Hg and beats/min, respectively.

vasodilator pinacidil was unchanged after methylamine (Fig. 2B). Heart rates, which were increased at time 0 in the benzylamine and phenethylamine groups, tended to rise after all pretreatments upon injection of HYD or pinacidil. The potentiation of HYD hypotension by methylamine was prevented by previous administration of isoniazid (Fig. 3A), as well as by pretreatment with catalase, administered either 15 or 60 min before the vasodilator (Fig. 3, B and C). Isoniazid but not catalase also diminished the slowly developing tachycardia after HYD. Methylamine, administered alone at the HYD potentiating dose of 200 mg/kg, lowered blood pressure within 10 min of injection, an effect which tended to subside over the next 2 h. Heart rate also decreased initially, but later increased persistently (Fig. 4A). Catalase alone produced a late fall in blood pressure, accompanied by a progressive increase in heart rate (Fig. 4B).

**Experiments in Rat Aortic Rings.** The pretreatment schedule used for methylamine in the above experiments, i.e., 200 mg/kg 2 h previously, did not influence the relaxant effects of HYD in rings obtained from animals thus pretreated (results not shown). Based on exploratory tests, the dose used in the definitive experiments was increased to 400 mg/kg and the pretreatment interval to 15 h. Such pretreatment did not influence contractile responses to norepinephrine, either in rings with endothelium (control,  $1.84 \pm 0.08$  g; pretreated,  $1.92 \pm 0.06$  g), or without endothelium (control,  $1.92 \pm 0.06$  g; pretreated,  $1.90 \pm 0.08$  g). Intact or rubbed preparations from rats receiving methylamine showed enhanced relaxant responses to HYD, but not to pinacidil (Fig. 5). Table 1 shows the  $pEC_{50}$  values derived from these concentration-response curves. Values for HYD were increased by approximately 0.4 log, whereas those for pinacidil showed no significant change. As shown in Fig. 6, methylamine at this pretreatment schedule also potentiated HYD hypotension.

**Determination of  $H_2O_2$  in Plasma.** Concentrations of  $H_2O_2$  in the different experimental groups are shown in Table 2. Direct measurements of the analyte agreed closely with indirect determinations based on  $O_2$  released by catalase. Methylamine increased and HYD decreased  $H_2O_2$  levels; the combination of both agents yielded values similar to control. As expected, catalase lowered concentrations of  $H_2O_2$ .

## Discussion

The present study was carried out in anesthetized rats using the hypotensive response to HYD as an index of the vasodilator activity of the drug. It is well known that responses to cardiovascular agents in general are modified by anesthesia, making results difficult to interpret. In the case of HYD, blood pressure responses in conscious animals are accompanied by marked reflex cardiac stimulant reactions that greatly modify the pressure effects. In anesthetized subjects, this factor is eliminated, as shown in the present experiments by the unchanged heart rate after HYD in the control groups, so that changes in blood pressure more accurately reflect changes in vascular dynamics.

The metabolism of benzylamine, phenethylamine, and methylamine by SSAO has been well studied in various *in vitro* conditions (Precious and Lyles, 1988; Elliott et al., 1989; Lyles et al., 1990). *In vivo* information is available only for methylamine and is restricted to documentation of increases in the urinary excretion of the substrate after inhibition of SSAO (Lyles and McDougall, 1989) or of formaldehyde, one of the products of enzyme activity after administration of exogenous amine (Deng et al., 1998). In the absence of data on the time course and extent of *in vivo* metabolism of these amines by SSAO, the pretreatment intervals as well as the doses used in the present study were chosen on the basis of results

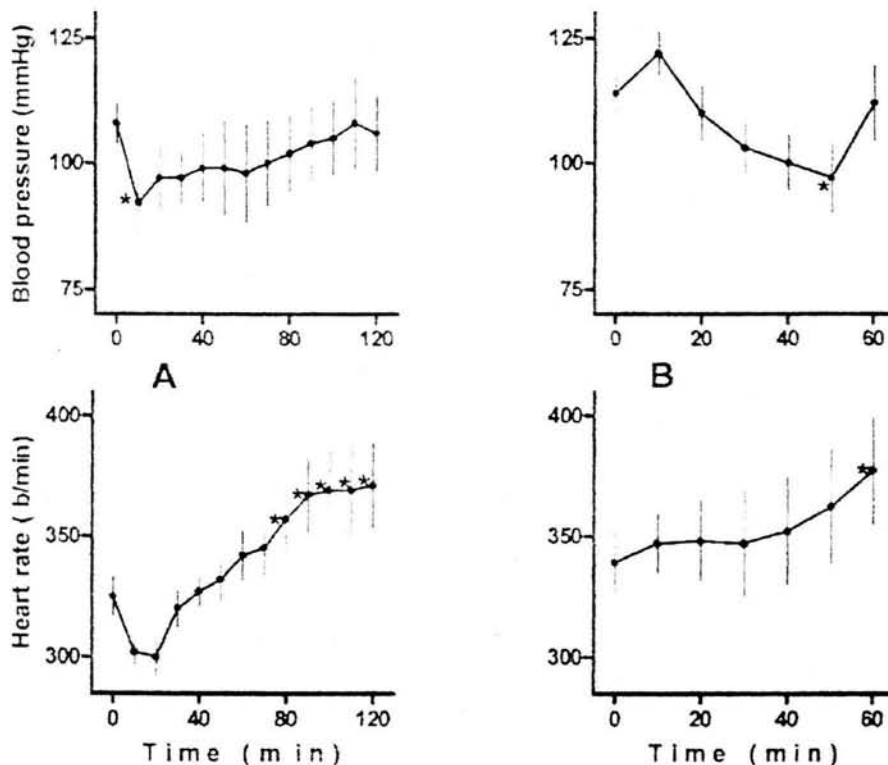


Fig. 4. Mean blood pressure and heart rate after administration of methylamine, 200 mg/kg i.v. (A) and catalase, 200,000 U/kg i.v. (B) to control untreated rats. Symbols correspond to means of six animals; vertical lines are S.E.M. Asterisks indicate significant differences from zero time values. Abscissae denote time in minutes after injection; ordinates, blood pressure or heart rate in mm Hg and beats/min, respectively.

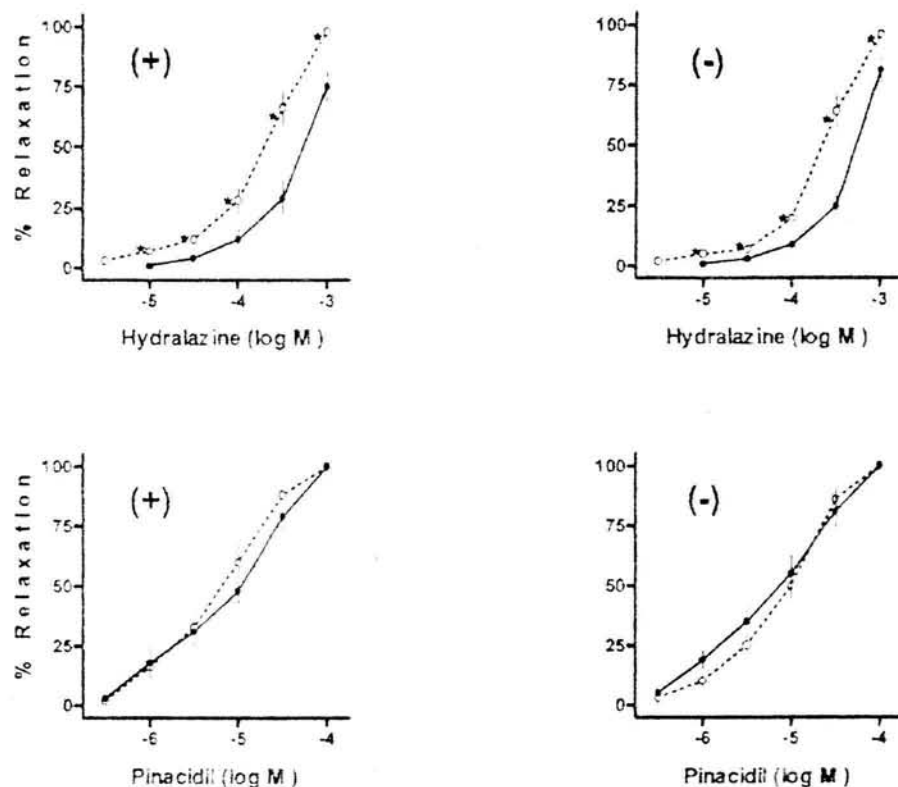


Fig. 5. Concentration-response curves to HYD and pinacidil in norepinephrine-contracted aortic rings obtained from control rats (solid circles) or from rats pretreated 15 h previously with methylamine, 400 mg/kg i.p. (open circles). Functional endothelium was either present (+) or absent (-) in the preparations. Symbols correspond to means of eight or nine rings; vertical lines are S.E.M. Asterisks indicate significant differences from control. Abscissae denote log concentrations of the vasodilators; ordinates, relaxation as percentage of contractile response to norepinephrine.

TABLE 1

pEC<sub>50</sub> values for HYD and pinacidil in aortic rings from rats with and without pretreatment with methylamine, 400 mg/kg i.p. 15 h previously

Values are means ± S.E.M. of 8 or 9 experiments. Rings with (+) and without (-) endothelium.

Group	Control	Methylamine
HYD (+)	3.31 ± 0.10	3.74 ± 0.06*
HYD (-)	3.28 ± 0.05	3.65 ± 0.05*
Pinacidil (+)	5.12 ± 0.11	5.22 ± 0.12
Pinacidil (-)	5.17 ± 0.13	5.06 ± 0.07

\*  $P < 0.05$  versus control.

of preliminary experiments. The relatively low dose of phenethylamine reflects its limiting central nervous system stimulant activity (Jackson, 1972), whereas the high dose needed for benzylamine is a consequence of its biotransformation by both SSAO and MAO (Blaschke, 1952).

The finding that all three SSAO substrates potentiate hypotension by HYD specifically is compatible with the postulated involvement of SSAO inhibition in pressure responses to the vasodilator. The documentation of potentiation in aortic rings also with or without endothelium further indicates that such involvement occurs in vascular smooth muscle, the site at which both SSAO activity and HYD inhibition thereof are postulated to take place. It is conceivable that preparations obtained from rats pretreated with methylamine contain increased amounts of metabolites of the amine, generated by SSAO and involved in vascular tone regulation; inhibition of the enzyme by HYD therefore results in enhanced relaxation. The higher doses of methylamine and the longer pretreatment interval necessary to demonstrate this effect in aortic rings probably reflects the inevitable partial washout of methylamine and/or its metabolites during tissue

preparation. In addition, HYD hypotension in vivo is more directly related to relaxation of resistance vessels, and it is possible that a conductance artery such as the aorta would be less sensitive to changes in reactivity to HYD.

Involvement of a product of SSAO action in HYD potentiation is supported by the experiments with isoniazid. This drug is a potent SSAO inhibitor (Vidrio et al., 2002), and when administered before methylamine, it presumably blocks metabolism of the amine by this enzyme. As a result, accumulation of SSAO products is prevented and potentiation of HYD hypotension is no longer apparent (Fig. 3A). It should be noted that rats pretreated with methylamine and isoniazid have a low baseline blood pressure (80 mm Hg), which contrasts with that of groups receiving methylamine alone (112 and 117 mm Hg). This suggests that the unmetabolized amine exerts a long-lasting hypotensive effect. The products generated by SSAO from benzylamine, phenethylamine, and methylamine are benzaldehyde, phenylacetaldehyde, and formaldehyde, in addition to ammonia and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As a group, these aldehydes are unlikely candidates for mediating increased vascular tone, since benzaldehyde and phenylacetaldehyde lower blood pressure (Wingard et al., 1955), and only formaldehyde is a pressor agent, albeit acting through release of catecholamines (Egle and Hudgins, 1974). At toxic concentrations, ammonia also increases blood pressure (Hindfelt and Plum, 1975), whereas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exerts vasoconstriction (Jin and Rhoades, 1997; Okatani et al., 1997; Rodríguez-Martínez et al., 1998; Yang et al., 1998; Shen et al., 2000). The fact that HYD potentiation by methylamine is prevented by the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenger catalase identifies this species as the metabolite involved in the hypotensive effect of HYD. It should be noted that the preventive action of catalase is clearer at the pretreatment interval of 15 min, compared with that of 60 min. This is in keeping with the half-life

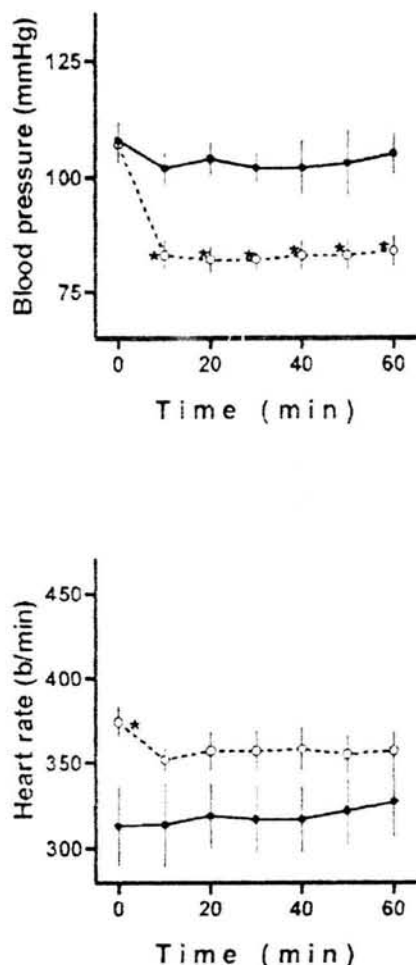


Fig. 6. Mean blood pressure and heart rate after administration of HYD, 0.1 mg/kg i.v. to control rats (solid circles) or to rats pretreated 15 h previously with methylamine, 400 mg/kg i.p. (open circles). Symbols correspond to means of six animals; vertical lines are S.E.M. Asterisks indicate significant differences from control. Abscissae denote time in minutes after HYD injection; ordinates, blood pressure and heart rate in mm Hg and beats/min, respectively.

TABLE 2

Influence of methylamine (200 mg/kg i.p. 2 h previously), HYD (0.1 mg/kg i.v. 15 min previously), a combination of both pretreatments, and catalase (200,000 U/kg i.v. 15 min previously) on plasma  $H_2O_2$  concentration ( $\mu M$ ) determined by direct and indirect polarographic methods

Values are means  $\pm$  S.E.M. of 12 experiments.

Group	Direct	Indirect
Control	15.25 $\pm$ 0.33	15.32 $\pm$ 0.29
Methylamine	23.19 $\pm$ 0.52*	24.08 $\pm$ 0.37*
HYD	11.28 $\pm$ 0.18*	10.74 $\pm$ 0.19*
Methylamine + HYD	15.28 $\pm$ 0.90	14.75 $\pm$ 0.32
Catalase	8.49 $\pm$ 0.64*	7.34 $\pm$ 0.59*

\*  $P < 0.01$  versus control.

of around 20 min reported for the i.v. injected natural enzyme (Turrens et al., 1984).

Additional confirmation of the involvement of  $H_2O_2$  in the methylamine/HYD interaction can be derived from determinations of this oxygen species in plasma. When administered at the schedule used in the blood pressure experiments, methylamine raises  $H_2O_2$ , presumably by increasing availability of SSAO substrate. The opposite effect is apparent after enzyme inhibition with a hypotensive dose of HYD,

when sufficient time (15 min) is allowed for the depressor response to develop. HYD also suppresses the increase in  $H_2O_2$  elicited by methylamine. The experiments with catalase confirm that the dose antagonizing HYD potentiation by methylamine is effective in lowering  $H_2O_2$  levels. No opinion can be formulated as to the adequacy of the  $H_2O_2$  concentration of approximately 15  $\mu M$  observed in control animals, judging from the fact that reported values for normal rat plasma vary from 2  $\mu M$  determined by an electrochemical method (Swei et al., 1997) to 45  $\mu M$  by a radioisotopic procedure (Varma and Devamanoharan, 1991). It should be noted that in view of the unreliability of the methods commonly used to measure  $H_2O_2$  in plasma (Nahum et al., 1988), the specificity of the present procedure was successfully verified as recommended by these authors by adding catalase to the measured samples to suppress the recorded direct signal; adding exogenous  $H_2O_2$  increments the recorded direct signal.

If  $H_2O_2$  generated in vascular smooth muscle contributes to vasoconstrictor tone, increases of this agent after administration of methylamine and, presumably, benzylamine and phenethylamine would be expected to raise blood pressure; however, with the possible exception of benzylamine, no such effect was observed. In fact, methylamine by itself tends to lower blood pressure, and rats pretreated with the presumably unmetabolized amine show a low baseline pressure. These findings imply that the blood pressure effects of methylamine are not due exclusively to generation of  $H_2O_2$ , but that other metabolites as well as the original amine may contribute to the overall response. Such complexity is not apparent with catalase, since its hypotensive effect (Fig. 4B) can be regarded as being related to lowering of  $H_2O_2$  levels. On the other hand, vascular tone regulation involves the local production of relaxing (nitric oxide, prostacyclin) and contracting (endothelins) factors. Normally, the relaxing factors predominate (Lüscher, 1990), so that any enhanced vasoconstrictor influence of  $H_2O_2$  would be efficiently counterbalanced and blood pressure would remain unchanged. Thus, the SSAO substrates would increase only the proportion of vascular tone due to  $H_2O_2$ , and subsequent enzyme inhibition by HYD would result in a greater than normal fall in blood pressure. It should be noted that the potential role of  $H_2O_2$  in the regulation of vascular tone appears to be very complex, and since in some experimental conditions it can also produce vascular smooth muscle relaxation (Burke and Wolin, 1987; Barlow and White, 1998), it can be regarded as both a contracting and a relaxing factor (Wolin, 1991).

Rats pretreated with benzylamine had a baseline blood pressure of 132 mm Hg, higher than any of the other experimental groups. This increased blood pressure is not apparent in Fig. 1 because the corresponding control group was matched in baseline pressure with the pretreated group, as described under *Materials and Methods*. The influence of benzylamine on blood pressure can be ascribed to an action not related to  $H_2O_2$  generation, namely blockade of catecholamine uptake by sympathetic nerve endings (Elliott and Callingham, 1991). This action could also account for the baseline tachycardia after benzylamine and phenethylamine (Fig. 1), although with the latter, its prominent cardiac sympathomimetic effect (Pesce and Adler-Graschinsky, 1983) could also be involved. Although methylamine did not significantly increase resting heart rate except at the higher dose

tested (400 mg/kg), it did uncover a slowly developing tachycardia after administration of HYD or pinacidil (Fig. 2). The present data provide no information as to the nature of this response, although they do suggest that it is partially dependent on increased amine metabolites, since it is considerably diminished by additional isoniazid pretreatment (Fig. 3A). That the metabolite involved is not  $H_2O_2$  is shown by the persistence of tachycardia after catalase pretreatment (Fig. 3, B and C). Unmasking of a reflex reaction to vasodilator-induced hypotension is unlikely because tachycardia occurred indistinctly in the presence of marked (Fig. 2A) or minimal (Fig. 3, B and C) hypotension.

In conclusion, pretreatment of rats with various SSAO substrates enhances the hypotensive effect of HYD, apparently through increased generation of the SSAO vasoconstrictor product  $H_2O_2$ . These results are compatible with the hypothesis that HYD vasodilation involves inhibition of vascular SSAO and decreased production of  $H_2O_2$ . They further suggest that such inhibition could represent a novel mechanism of hypotensive activity, possibly shared by other known antihypertensive drugs (Banchelli et al., 1986).

## References

- Baker JRJ, Hedwall PR, and Hermesmeyer K (1992) Subcellular distribution of hydralazine in rat single vascular muscle cells. *Cell Biol Int Rep* 16:1023-1039.
- Banchelli G, Bertocci B, Raimondi L, Soldani G, Del Taccu M, and Buffoni F (1986) Guanabenz as inhibitor of copper-containing amine oxidases. *Agents Actions* 18: 45-48.
- Bang L, Nielsen-Kudsk JE, Grøhn N, Trautner S, Theilgaard SA, Olesen SP, Boesgaard S, and Aldershvile J (1998) Hydralazine-induced vasodilation involves opening of high conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels. *Eur J Pharmacol* 361:43-49.
- Barlow RS and White KE (1998) Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating  $BK_{Ca}$  channel activity. *Am J Physiol* 275:H1283-H1289.
- Blaschko H (1952) Amine oxidase and amine metabolism. *Pharmacol Rev* 4:415-458.
- Burke TM and Wolin MS (1987) Hydrogen peroxide elicits pulmonary arterial relaxation and guanylate cyclase activation. *Am J Physiol* 252:H721-H732.
- Callingham BA, Crusbie AC, and Rous BA (1995) Some aspects of the pathophysiology of semicarbazide-sensitive amine oxidase enzymes. *Prog Brain Res* 106:305-321.
- Deng Y, Boomala F, and Yu PH (1998) Deamination of methylamine and aminoacetone increases aldehydes and oxidative stress in rats. *Life Sci* 63:2045-2058.
- Díaz-Arista P, Lorenzana-Jiménez M, Vidrio H, and Baeza A (2002) Electroanalytical determination of hydrogen peroxide in liquid biological samples. *Proc West Pharmacol Soc* 45:112-113.
- Egle JL and Hudgins PM (1974) Dose-dependent sympathomimetic and cardioinhibitory effects of acrolein and formaldehyde in the anesthetized rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 28:358-366.
- Ellershaw DC and Gurney AM (2001) Mechanisms of hydralazine induced vasodilation in rabbit aorta and pulmonary artery. *Br J Pharmacol* 134:621-631.
- Elliott J and Callingham BA (1991) Effect of benzylamine and its metabolites on the responses of the isolated perfused mesenteric arterial bed of the rat. *J Auton Pharmacol* 11:323-335.
- Elliott J, Callingham BA, and Sharman DF (1989) Semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) of the rat aorta. Interactions with some naturally occurring amines and their structural analogues. *Biochem Pharmacol* 38:1507-1515.
- Hindfelt B and Plum F (1975) L-methionine DL-sulphoximine and acute ammonia toxicity. *J Pharm Pharmacol* 27:456-458.
- Jackson DM (1972) The effect of  $\beta$ -phenethylamine upon spontaneous motor activity in mice: a dual effect on locomotor activity. *J Pharm Pharmacol* 24:383-389.
- Jin N and Rhoades RA (1997) Activation of tyrosine kinases in  $H_2O_2$ -induced contraction in pulmonary artery. *Am J Physiol* 272:H2686-H2692.
- Lüscher TF (1990) Imbalance of endothelium-derived relaxing and contracting factors. A new concept in hypertension? *Am J Hypertens* 3:317-330.
- Lyles GA (1995) Substrate-specificity of mammalian tissue-bound semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Prog Brain Res* 106:293-303.
- Lyles GA and Callingham BA (1982) Hydralazine is an irreversible inhibitor of the semicarbazide-sensitive, cloglycine-resistant amine oxidase in rat aorta homogenates. *J Pharm Pharmacol* 34:139-140.
- Lyles GA, Garcia-Rodriguez J, and Callingham BA (1983) Inhibitory actions of hydralazine upon monoamine oxidizing enzymes in the rat. *Biochem Pharmacol* 32:2515-2521.
- Lyles GA, Holt A, and Marshall CMS (1992) Further studies on the metabolism of methylamine by semicarbazide-sensitive amine oxidase in human plasma, umbilical artery and rat aorta. *J Pharm Pharmacol* 42:332-338.
- Lyles GA and McDougall SA (1989) The enhanced daily excretion of urinary methylamine in rats treated with semicarbazide or hydralazine may be related to the inhibition of semicarbazide-sensitive amine oxidase activities. *J Pharm Pharmacol* 41:97-100.
- Lyles GA and Singh I (1985) Vascular smooth muscle cells: a major source of the semicarbazide-sensitive amine oxidase in the rat aorta. *J Pharm Pharmacol* 37: 637-643.
- Nahum A, Wood LDH, and Sznajder JI (1988) Measurement of hydrogen peroxide in plasma and blood. *Free Radic Biol Med* 6:479-484.
- Ogiso T, Ikawi M, and Ohtsuki N (1985) Pharmacokinetics of formation and excretion of some metabolites of hydralazine and their hypotensive effect in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 233:485-490.
- Okatani Y, Watanabe K, Wakatsuki A, and Sagami Y (1997) Vasospastic action of hydrogen peroxide in human umbilical artery: relation to protein kinase C and calcium influx. *Acta Obstet Gynecol Scand* 76:897-902.
- Orallo F, Gil-Longo J, Bardán E, and Calleja JM (1991) Comparison of the effects of hydralazine and nifedipine on contractions and  $^{45}Ca$  influx in rat aorta. *J Pharm Pharmacol* 43:356-359.
- Pesce G and Adler-Graschinsky E (1983) Comparison of the effects of  $\beta$ -phenylethylamine and *d*-amphetamine on rat isolated atria. *J Pharmacol Exp Ther* 227: 205-214.
- Precious E and Lyles GA (1988) Properties of a semicarbazide-sensitive amine oxidase in human umbilical artery. *J Pharm Pharmacol* 40:27-33.
- Rodríguez-Martínez MA, García-Cohen EC, Baena AB, González R, Salasces M, and Marín J (1998) Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanisms involved. *Br J Pharmacol* 125:1329-1335.
- Shen JZ, Zheng XF, and Kwan CY (2000) Evidence for  $P_2$ -purinoceptors contribution in  $H_2O_2$  induced contraction of rat aorta. *Eur J Pharmacol* 344:169-181.
- Swei A, Lucy F, DeLano FA, and Schmid-Schönbein GW (1997) Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. *Hypertension* 30:1628-1633.
- Turrents JF, Crapo JD, and Freeman BA (1984) Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. *J Clin Invest* 73:87-95.
- Varma SD and Devamanoharan PS (1991) Hydrogen peroxide in human blood. *Free Radic Res Commun* 14:125-131.
- Vidrio H (1994) Potentiation of cardiovascular responses to hydralazine by diverse hydrazine derivatives. *J Pharmacol Exp Ther* 271:171-175.
- Vidrio H, Medina M, Fernández G, Lorenzana-Jiménez M, and Campos AE (2002) Enhancement of hydralazine hypotension by low doses of isoniazid: Possible role of semicarbazide-sensitive amine oxidase inhibition. *Gen Pharmacol* 35:195-204.
- Wibo M, Duong AT, and Godfrand T (1980) Subcellular location of semicarbazide-sensitive amine oxidase in rat aorta. *Eur J Biochem* 112:87-94.
- Wingard C, Hitchcock P, and Teague RS (1955) A survey of aldehydes with respect to their action on the blood pressure. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 102:65-84.
- Wolin MS (1991) Activated oxygen metabolites as regulators of vascular tone. *Klin Wochenschr* 69:1046-1049.
- Yang ZW, Zheng T, Zhang A, and Altura BM (1995) Mechanisms of hydrogen peroxide-induced contractions of rat aorta. *Eur J Pharmacol* 344:169-181.

Address correspondence to: Dr. Horacio Vidrio, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70297, 04510 México, D.F., México. E-mail: vidrio@servidor.unam.mx

## ÍNDICE

---

Prólogo	1
Abreviaturas	3
Resumen	5
Abstract	6
1.0 Introducción	7
2.0 Antecedentes	
2.1 Generalidades sobre H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	9
2.2 Influencia de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en el metabolismo.	10
2.3 Cuantificación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por métodos electroquímicos.	17
2.4 Validación.	20
2.5 Fundamentos de electroquímica.	25
2.6 Técnica electroquímica a utilizar.	31
2.7 Variables que afectan la velocidad de reacción.	35
3.0 Objetivos	36
4.0 Parte experimental	
4.1 Reactivos.	38
4.2 La celda, los electrodos y equipos.	39
4.3 Calibración de material volumétrico.	41
4.4 Establecimiento de condiciones operatorias.	41
4.5 Determinación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en muestras clínicas.	41
4.6 Programas de perturbación	
4.6.1 Determinación directa.	42
4.6.2 Determinación indirecta.	42
5.0 Resultados y análisis de resultados	
5.1 Establecimiento de las condiciones operatorias y determinación de los parámetros estadísticos.	
5.1.1 Método directo.	43
5.1.2 Método indirecto.	56
5.2 Comparación de ambas metodologías.	70

---

---

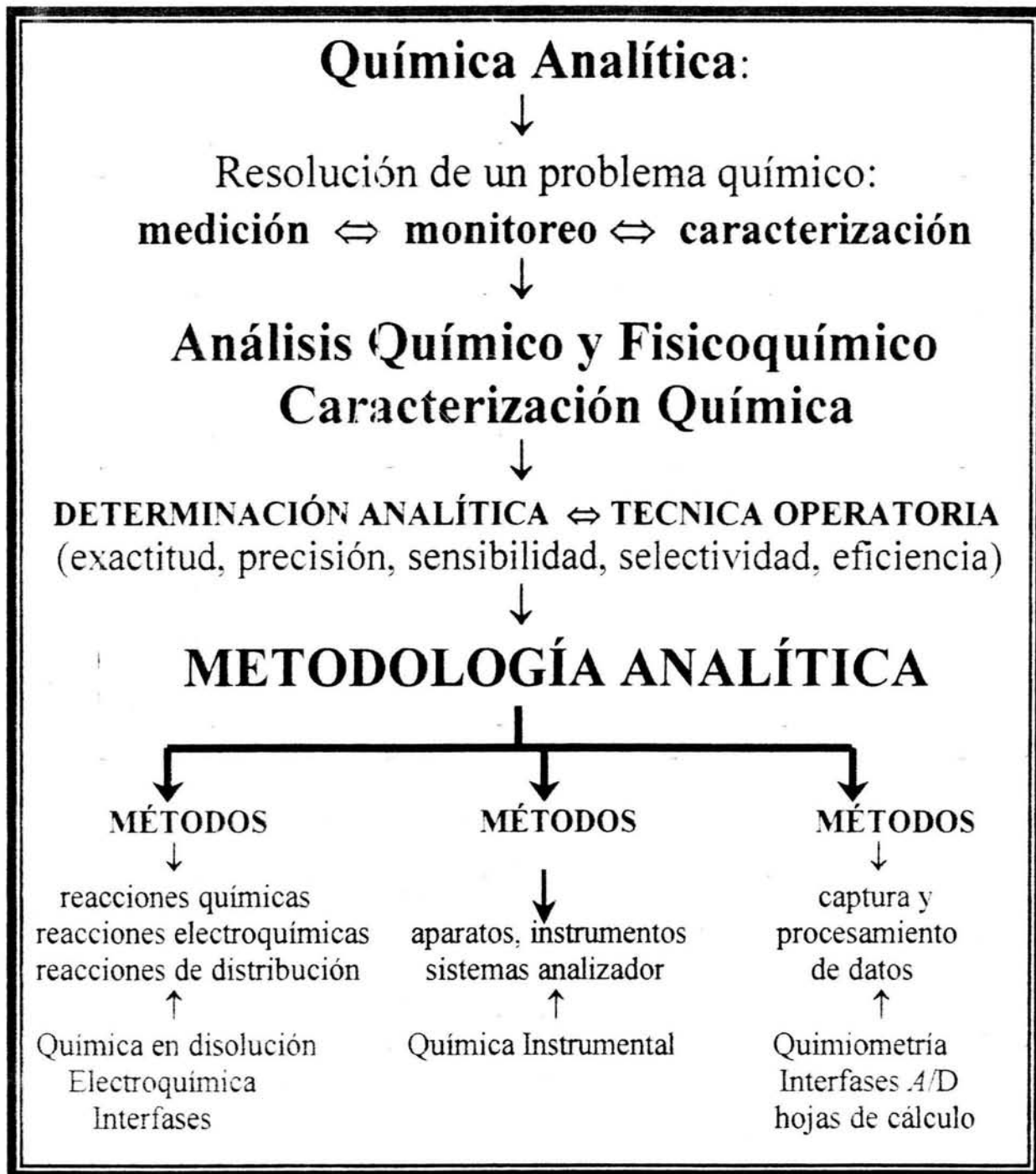
5.3 Aplicación del método - Determinación de $H_2O_2$ en muestras clínicas control y tratadas.	74
6.0 Protocolo para la determinación de $H_2O_2$ en muestras clínicas de plasma.	78
7.0 Conclusiones	81
8.0 Bibliografía	83
9.0 Anexos	
Anexo 1. Alternativas para la cuantificación de $H_2O_2$ empleando técnicas no electroquímicas	
Anexo 2. Calibración del material volumétrico	90
Anexo 3. Calibración de la bureta de 10 mL	91
Anexo 4. Tratamiento de las muestras	91
Anexo 5. Determinación volumétrica de $H_2O_2$	92
Anexo 6. Análisis de residuos para la determinación de peróxido de hidrógeno por método directo	92
Anexo 7. Cuadrado de los residuos para 12, 11 y 10 observaciones en la determinación de peróxido de hidrógeno por método directo	92
Anexo 8. Análisis de residuos para la determinación de peróxido de hidrógeno por método indirecto	93
Anexo 9. Cuadrado de los residuos para 8, 7 y 6 observaciones en la determinación de peróxido de hidrógeno por método indirecto	93
Anexo 10. Comparación de ambos métodos	94
Anexo 11. ANOVA de dos factores	95

---



## PRÓLOGO

El presente trabajo se realizó de acuerdo al diagrama conceptual de trabajo analítico del Laboratorio de Investigación y Enseñanza Experimental del Dr. Alejandro Baeza que se muestra en la siguiente página.



**ESQUEMA CONCEPTUAL DEL TRABAJO ANALÍTICO**

(A. Baeza, Rev. Chilena Educ. Científica, 2003.)

## LISTA DE ABREVIATURAS

$C$ :	Capacitancia
$C_i$ :	Concentración molar efectiva de la especie $i$
$D_i$ :	Coefficiente de difusión
$\frac{\partial C_i(x)}{\partial x}$ :	Gradiente de concentración a la distancia $x$
$\frac{\partial \phi(x)}{\partial x}$ :	Gradiente de potencial
$e^-$ :	Electrón
$E$ :	Potencial a través del capacitor
$E_z$ :	Potencial de carga cero
$E_{1/2}$ :	Potencial de media onda
$EA$ :	Electrodo auxiliar
$ECS$ :	Electrodo de calomel saturado
$ER$ :	Electrodo de referencia
$ET$ :	Electrodo de trabajo o indicador
$E_f$ :	Potencial final
$E_{in}$ :	Potencial de inicio
$\Delta E$ :	Pulso de potencial impuesto
$F$ :	Constante de Faraday
$F$ :	F de Fisher
$i_{capacitiva}$ :	Corriente capacitiva o residual
$i_{convectiva}$ :	Corriente por convección
$i_{difusión}$ :	Corriente por difusión
$i_{faradaica}$ :	Corriente faradaica
$i_{medida}$ :	Corriente total medida
$i_{migración\ iónica}$ :	Corriente por migración iónica
$\Delta i$ :	Diferencia en la intensidad de corriente
$IHP$ :	Plano interno de Helmholtz
$J_i(x)$ :	Flujo total de la especie $i$ a la distancia $x$
$m$ :	Velocidad de flujo al electrodo goteante de mercurio

---

n :	Número de observaciones
OHP :	Plano externo de Helmholtz
Ox :	Oxidante
pH :	$-\log [H^+]$
q :	Carga en el capacitor
Q :	Cantidad de electricidad
R :	Constante de los gases ideales
Red :	Reductor
DER :	Desviación estándar relativa
SI :	Sistema Internacional
$\sigma$ :	Desviación estándar
$\sigma^2$ :	Varianza
$\sigma_B$ :	Desviación estándar de la ordenada al origen
t :	Tiempo
t :	t de student
T :	Temperatura
$\tau$ :	Tiempo de muestreo
v :	Velocidad de la reacción al electrodo
$v_b$ :	Velocidad de barrido
$v_{mi}$ :	Velocidad de transferencia de masa
$v(x)$ :	Velocidad a la cual el volumen de un elemento se mueve a lo largo del eje x
y :	Límite de decisión, detección y cuantificación.
$y_B$ :	Valor de la ordenada al origen
$z_i$ :	Carga de la especie i

---

---

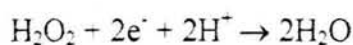
**RESUMEN**

La determinación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en animales superiores es de gran importancia debido a que dicho analito indica la participación de especies tóxicas oxidantes en el daño de los tejidos, además se asocia a la acción biológica de algunos fármacos, así como a ciertas condiciones fisiológicas o patológicas tales como ejercicio, hipertensión arterial e infarto.

En publicaciones recientes se han reportado dichas determinaciones por espectrofotometría y HPLC, quimioluminiscencia y cronoamperometría, pero aún no se ha validado alguna metodología que lleve a la determinación de  $H_2O_2$  en muestras clínicas con calidad.

En este trabajo se describe la determinación de  $H_2O_2$  por el método de polarografía diferencial de pulsos directa por:

- a) reducción directa del peróxido de hidrógeno en  $-0.92$  V vs SCE debida a

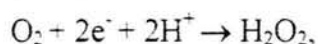


con una ecuación de calibración de:

$$\Delta i = 3.03 \pm 0.09 [H_2O_2] + 0.13 \pm 0.07,$$

y alternativamente

- b) por la onda de reducción del oxígeno en  $-0.2$  V vs SCE debida a



producido por la acción de la catalasa, cuya ecuación de calibración es:

$$\Delta i = 6.0 \pm 0.1 [H_2O_2] + 2.4 \pm 0.2.$$

Dicho analito se determinó en muestras de suero de ratas Wistar adultos machos control, inhibidos y estimulados en la producción de peróxido de hidrógeno obteniéndose concentraciones de  $15.25 \pm 0.85$ ,  $11.28 \pm 0.47$  y  $23.17 \pm 1.35$   $\mu$ M, respectivamente. Se evaluó el efecto de la matriz, amortiguador, linealidad, porcentaje de recobro, límite de detección y cuantificación, así como el coeficiente de variación.

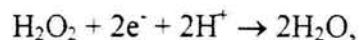
---

**ABSTRACT**

Determination of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) in higher animals has achieved great importance, since this product indicates toxic tissue damage due to external factors, particularly oxidative stress. In addition, it is associated with the biological action of some drugs, as well as with physiological and pathological conditions such as exercise, arterial hypertension and heart failure.

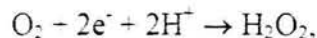
Current spectrophotometric, HPLC chemiluminescence and chronoamperometry methods of hydrogen peroxide analysis are indirect and require time-consuming chemical sample preparation that often leads to degradation of  $H_2O_2$ . In contrast, electrochemical measurements require little or any sample preparation, so that they appear to be more suitable for hydrogen peroxide determinations, even *in situ*.

This work describes  $H_2O_2$  measurement by differential pulse polarography by detecting: a) direct reduction peak of hydrogen peroxide on -0.92V due to



and alternatively

b) reduction peak on -0.20V of oxygen,



produced by the action of catalase added to the reaction media. Calibration plots

$$\Delta i = 3.03 \pm 0.09 [H_2O_2] + 0.13 \pm 0.07 \quad \text{and} \quad \Delta i = 6.0 \pm 0.1 [H_2O_2] + 2.4 \pm 0.2$$

are obtained by direct and indirect detection, respectively. In normal and untreated rat plasma samples using different protein precipitating agents, a concentration of  $15.25 \pm 0.85$ ,  $11.28 \pm 0.47$  and  $23.17 \pm 1.35$   $\mu M$  of  $H_2O_2$  was obtained.

---

## 1.0 INTRODUCCIÓN

La bioquímica y medicina están interesadas en el desarrollo de un método analítico para la determinación de  $H_2O_2$  (peróxido de hidrógeno) en muestras biológicas, tales como plasma o suero, lo anterior se debe al hecho de que dicho analito indica la participación de especies tóxicas oxidantes en el daño de los tejidos.

En publicaciones recientes se han reportado dichas determinaciones por espectrofotometría, HPLC, quimioluminiscencia y cronoamperometría, todas ellas utilizando la oxidación de un sustrato por una peroxidasa; participando en dicha reacción el analito de interés, e incluso el diseño de sensores a base de una molécula mediadora, como polímeros o complejos inorgánicos; pero cabe señalar que aún no se ha validado alguna metodología que lleve a la determinación de  $H_2O_2$  en muestras clínicas con calidad.

Para verificar que la señal generada se deba a la presencia de peróxido de hidrógeno, la metodología propuesta debe cumplir con dos parámetros que son: la adición de catalasa (como un elemento selectivo) y la adición posterior de  $H_2O_2$  (para corroborar que el incremento en la propiedad medida se deba al incremento en la concentración de este analito).

El desarrollo de las técnicas electroquímicas y en particular de la polarografía diferencial de pulsos, ha permitido llegar a determinar analitos al nivel de trazas. Estas técnicas proporcionan la ventaja de poder analizar tanto compuestos orgánicos como inorgánicos, además que la preparación de las muestras requiere de un pequeño tratamiento o ninguno, lo que conlleva a la degradación del analito tiempo y los costos de análisis se abaten por la cantidad de reactivos empleados y la cantidad de desechos. Dichas técnicas electroquímicas se han comparado con otras técnicas como la espectrofotometría y se ha demostrado que no hay diferencias significativas entre dichas metodologías.

En la técnica polarografía diferencial de pulsos sobre el electrodo goteante de mercurio, el peróxido de hidrógeno genera una señal debida a la reducción de dicho analito, que al reaccionar con la catalasa genera oxígeno, el cual presenta una señal de reducción en el sistema de análisis, por lo cual se puede utilizar para la determinación de peróxido de hidrógeno en muestras de suero y/o plasma de manera directa e indirecta respectivamente.

Con los fundamentos presentados anteriormente, el enfoque del siguiente trabajo es efectuar la determinación electroquímica de peróxido de hidrógeno por polarografía diferencial de pulsos (técnica no reportada), confirmando la señal por adición de catalasa y adición de una solución estándar de  $H_2O_2$ .

Las condiciones operatorias evaluadas fueron: amortiguador, electrolito soporte, matriz y los parámetros estadísticos: límite de detección y cuantificación, intervalo lineal, coeficiente de variación, reproducibilidad y porcentaje de recuperación.

Basándose en los resultados obtenidos se eligieron las condiciones operatorias óptimas que permiten la determinación en muestras control, estimuladas e inhibidas en su producción de peróxido de hidrógeno.



**Falta página**

**N°**

**9**

---

## 2.2 Metabolismo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrógeno).

En el metabolismo energético del hombre los metabolitos resultantes de la actividad del oxígeno son moléculas o átomos de alta reactividad (inestables químicamente) que pueden alterar la estructura y funcionamiento de moléculas biológicas importantes, como enzimas, fosfolípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.

Los radicales libres pueden provenir del metabolismo normal del organismo o de lesiones fisiopatológicas inducidas por isquemia o injurias diversas. Se ha calculado que de un 2 a 5% del O<sub>2</sub> consumido en el metabolismo normal se transforma en radicales libres, las fuentes principales son las enzimas asociadas al metabolismo del ácido araquidónico, como la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa y el citocromo P-450, pero éstos son normalmente inactivados por los mecanismos enzimáticos tisulares. [3]

El oxígeno tiene un rol vital en la respiración como receptor terminal de electrones, pues se reduce a agua al aceptar 4 electrones, pero una pequeña proporción forma radicales libres al aceptar un número menor de electrones; de esta manera el oxígeno puede reducirse al tomar un electrón a anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), al incorporar dos electrones a peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y a radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>) cuando acepta tres electrones. (Tabla 1)

Tabla 1. Formación de agua y radicales libres por reducción directa del oxígeno.

$O_2 + 1e^- \leftrightarrow O_2^{\bullet-}$
$O_2 + 2e^- + 2H^+ \leftrightarrow H_2O_2$
$O_2 + 3e^- + 2H^+ \leftrightarrow OH^{\bullet} + OH^-$
$O_2 + 4e^- + 4H^+ \leftrightarrow 2H_2O$

Otra fuente importante de radicales hidroxilo es la reacción de Haber-Weiss. (Tabla 2)

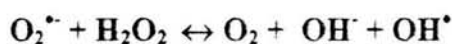
[4]

Tabla 2. Formación de radicales hidroxilo por la reacción de Haber-Weiss.

$O_2^{\bullet-} + Fe^{3+} \leftrightarrow O_2 + Fe^{2+}$
$Fe^{2+} + H_2O_2 \leftrightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet}$
$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \leftrightarrow O_2 + OH^- + OH^{\bullet}$

La mayoría de los radicales libres de interés biológico suelen ser extremadamente reactivos e inestables, por lo que tienen un período de vida media muy corto, no obstante cuando un radical libre reacciona con un compuesto no radical pueden formarse otros radicales libres, de manera que es posible que se creen reacciones en cadena y den lugar a efectos biológicos lejos del sistema que originó el primer radical.

Otros metabolitos reactivos del oxígeno no son propiamente radicales pero tienen similares propiedades, como el peróxido de hidrógeno, por lo que habitualmente se le incluye en este grupo, ya que dicho compuesto lleva a cabo una reacción con el oxígeno para la producción de radicales libres.



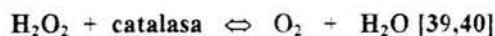
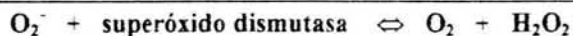
Los radicales libres son protagonistas de numerosas enfermedades que provocan reacciones en cadena; estas reacciones son eliminadas por la acción de otras moléculas que se oponen a este proceso tóxico en el organismo, conocidos como antioxidantes defensivos. Un grupo trabaja sobre la cadena del radical inhibiendo los mecanismos de activación, un segundo grupo neutraliza la acción de los radicales libres ya formados, por tanto detiene la cadena de propagación, en este grupo se encuentran enzimas como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa.

Con base en su función los antioxidantes se clasifican en primarios, secundarios y terciarios.

Los antioxidantes primarios, son las enzimas y podemos citar a:

⇒ **Superóxido dismutasa** (SOD) cuya función es neutralizar a los aniones y radicales superóxido cuando los transforma a oxígeno y peróxido de hidrógeno, el cual puede ser inactivado por acción de la catalasa y de la glutatión peroxidasa. (**Tabla 3**)

**Tabla 3. Enzimas neutralizantes de radicales libres.**



⇒ **Glutatión peroxidasa** (GPX) que convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que puedan formar radicales libres.

⇒ **Proteínas de unión a metales** (GR) que frenan la disponibilidad del Fe, necesario para la formación del radical  $\text{OH}^\cdot$ , mediante la reacción de Haber-Weiss antes descrita. La coenzima Q10 muscular, es otro ejemplo y participa muy activamente en el transporte de electrones entre el ciclo del ácido cítrico y la cadena respiratoria, actúa como barredor de radicales libres.

En el segundo grupo se encuentran los no enzimáticos, de los cuales hay dos subgrupos, entre los que podemos mencionar:

⇒ **Antioxidantes hidrofílicos** como la bilirrubina, la albúmina, el ácido úrico y la vitamina C, la cual reacciona con el anión superóxido y estabiliza el radical hidroxilo.

⇒ **Antioxidantes lipofílicos** entre los que se encuentran los carotenoides, las ubiquinonas y la vitamina E (alfatoco-ferol) que es el mayor antioxidante liposoluble en las membranas celulares, y sirve para proteger de la peroxidación de lípidos actuando directamente con una variedad de oxiradicales.

En el tercer grupo se incluyen a las proteasas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxido reductasa.

La defensa antioxidante, enzimática y no enzimática protege al organismo contra el daño oxidativo, pero no con el 100% de eficiencia, esto genera a que los antioxidantes no enzimáticos se añadan frecuentemente a los alimentos para prevenir la peroxidación lipídica que se asocia a numerosas patologías y a estados de estrés oxidativo. [5,6]

El efecto en las proteínas, los lípidos insaturados, los ácidos nucleicos y carbohidratos se describen a continuación:

### **Proteínas**

Los radicales libres de oxígeno pueden reaccionar directamente con el ligante metálico de muchas metaloproteínas. Se ha comprobado que el hierro de la oxihemoglobina puede reaccionar con el radical superóxido o el peróxido de hidrógeno para formar metahemoglobina. Otra importante hemoproteína citoplásmica, la catalasa, es inhibida por el  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , que la convierte a sus formas inactivas ferroxí y ferrilo. Además el peróxido de hidrógeno, producto de la dismutación del radical superóxido, reduce el  $\text{Cu}^{2+}$  de la superóxido dismutasa CuZn a  $\text{Cu}^+$ , reaccionando después con él y generando radical hidroxilo; el cual a su vez ataca a un residuo adyacente de histidina del centro activo del enzima, necesario para la actividad catalítica. [7]

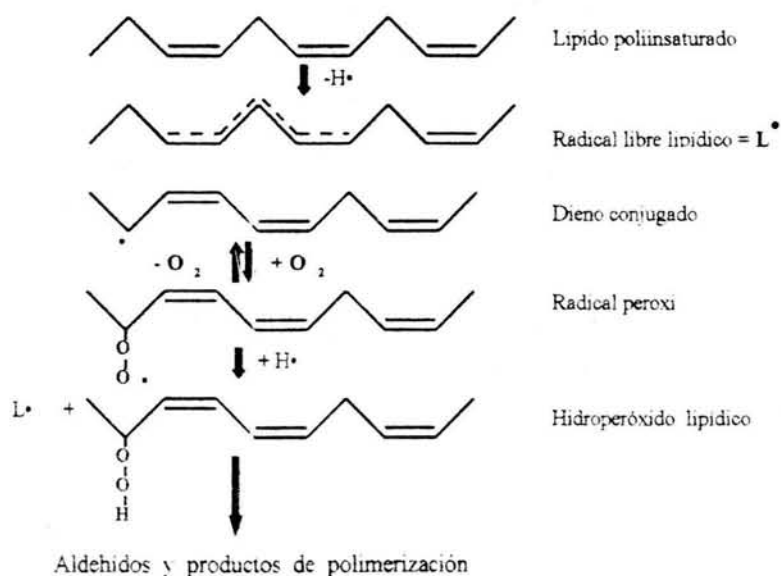
Las moléculas insaturadas o que contienen azufre son susceptibles a ser atacadas por los radicales libres, así las proteínas con proporciones elevadas de triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína pueden sufrir modificaciones e inhibirse en presencia de radicales libres, provocando entrecruzamientos y fenómenos de agregación, que se ven favorecidos por la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares.

Los enlaces peptídicos pueden romperse tras la oxidación de residuos de prolina por radicales hidroxilo o superóxido. Además la reacción de los radicales libres con las proteínas también puede generar subproductos que amplificarían el daño, como ejemplo podemos citar la oxidación del triptófano hasta  $H_2O_2$  y N-formil quinurenina, molécula que reacciona con los grupos amino y provoca entrecruzamientos entre proteínas y lípidos. [8]

### *Lípidos*

Los radicales libres hidroxilo pueden reaccionar con los ácidos grasos de los fosfolípidos y otros componentes lipídicos de las membranas para formar hidroperóxidos lipídicos.

Este proceso de peroxidación lipídica comienza cuando el radical libre elimina un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metileno de la cadena hidrocarbonada para rendir un radical libre lipídico ( $L^\bullet$ ). Los ácidos grasos poliinsaturados de membrana son susceptibles de ser atacados por radicales libres, puesto que contienen grupos metileno separados por dobles enlaces que debilitan el enlace C-H del metileno. Cuando el radical lipídico se origina, sufre inmediatamente un reajuste molecular, produciéndose un dieno conjugado que puede reaccionar con el  $O_2$  y formar un radical hidroperoxilo. Este radical libre da lugar a endoperóxidos, o bien, puede tomar un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de otro ácido graso poliinsaturado adyacente para formar, de nuevo, un radical libre lipídico y un hidroperóxido (**figura 2**). El radical lipídico se combina con otra molécula de oxígeno y se establece una cadena de propagación del daño peroxidativo. Por otro lado, si el hidroperóxido, que es un compuesto estable, entra en contacto con iones metálicos de transición, producirá más radicales libres que iniciarán y propagarán otras reacciones en cadena. De esta manera las membranas resultan seriamente dañadas y, por tanto, su funcionalidad se ve alterada.



**Figura 2. Reacciones de peroxidación lipídica.**

Los productos finales del proceso son hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos, que pueden difundir lejos del lugar donde se originaron y causar edema celular e influir en la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis, también pueden alterar la actividad de la fosfolipasa e inducir la liberación de ácido araquidónico y la subsecuente formación de prostaglandina y distintos endoperóxidos. [9,10]

### *Ácidos nucleicos*

Este caso es una de las razones de las aberraciones cromosómicas producidas por las modificaciones químicas que sufren las bases y los azúcares del DNA al reaccionar con los radicales libres, especialmente con el  $OH^\bullet$ . Las modificaciones químicas de los nucleótidos provocan la ruptura de las hebras del DNA; si el daño es tan grande que no puede ser reparado, se produce una mutación, o bien, la célula muere. [11,12]

### *Carbohidratos*

Estos compuestos son dañados en menor grado que los anteriores, así los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres fragmentándose en unidades más sencillas. [13] El ácido hialurónico se despolimeriza provocando un descenso en la viscosidad del líquido sinovial de las articulaciones. [14]

---

Como ya se ha mencionado, a pesar de que los radicales libres son especies extremadamente reactivas y se están produciendo continuamente en el organismo, las células disponen de sistemas de protección. El problema sólo surge cuando hay una sobreproducción o cuando los sistemas antioxidantes están debilitados.

Algunos de los mecanismos que provocan este desbalance son:

- La actividad física vigorosa que incrementa el consumo de oxígeno de 10 a 15 veces por encima del valor de reposo para satisfacer las demandas de energía. Los medios por los cuales podrían ser generados estos radicales son: consumo de oxígeno elevado, producción de intermediarios como superóxidos, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos, incremento de epinefrina y otras catecolaminas, y la producción de ácido láctico que es susceptible de transformar a un anión superóxido (poco perjudicial) a un radical hidroxilo (fuertemente perjudicial). [15]
- La cardiopatía isquémica y el infarto agudo del miocardio son la expresión de un proceso que comienza con un exceso de radicales libres, los cuales inician el proceso arteroesclerótico por daño en la pared vascular, provocando la penetración al espacio subendotelial de las proteínas de baja densidad (LDL) y por ende a la placa arteroesclerótica. [16]
- La activación de muchos xenobióticos a intermediarios radicales se puede realizar por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Pero en cualquier caso, la especie radical libre ( $R^{\bullet}$ ), formada por la captación de un electrón, puede sufrir una reducción adicional y convertirse en un metabolito capaz de interactuar con distintas biomoléculas, o bien, en presencia de oxígeno, puede transferir el electrón al oxígeno molecular, produciendo el radical anión superóxido y regenerando la molécula original (R). La formación de intermediarios radicales libres de muchos compuestos químicos está catalizada por la NAD(P)H-citocromo P450 reductasa, una flavoproteína que utiliza NAD(P)H como donador electrónico. En estos casos, se establece un ciclo redox en el que hay un gran consumo de NAD(P)H y oxígeno, con generación de radicales superóxido y otras especies reactivas de oxígeno (**figura 3**). Este ciclo redox conduce a una situación de estrés oxidativo, y en casos extremos, a la muerte celular. [18]



Figura 3. Ciclo redox de xenobióticos.

Los xenobióticos cuya toxicidad puede ser atribuida a la formación de radicales libres de oxígeno son:

1. Paraquat y diquat
2. Aminas aromáticas
3. Dióxido de nitrógeno
4. Humo del tabaco
5. Etanol
6. Paracetamol
7. Clorpromazina
8. Nitrofurantoína y metronidazol
9. Hidrocarburos halogenados
10. Adriamicina y daunomicina
11. Bleomicinas, fleomicinas y talisomicinas
12. Hidralazina, Isoniazida e iproniazida
13. Pamaquina y primaquina
14. Psoralenos.



### 2.3 Cuantificación de $H_2O_2$ por métodos electroquímicos.

La cuantificación del peróxido de hidrógeno es importante en estudios clínicos, biológicos y del medio ambiente; además dicho reactivo se utiliza en muchas industrias y procesos relacionados como un oxidante, blanqueador y agente esterilizante. A altas concentraciones en la atmósfera, afecta la salud humana y puede causar irritación en los ojos y piel. Además este analito tiene funciones importantes en procesos heterogéneos como oxidante, produciendo ácidos sulfúrico y nítrico en la atmósfera y lluvia. Por ello numerosos métodos han sido propuestos para la determinación de peróxido de hidrógeno.

En general podemos decir que este compuesto usualmente se cuantifica determinando los productos de descomposición de este analito, los cuales son promovidos por un metal de transición, una enzima u otra sustancia susceptible a reaccionar (cromógenos) y formar un producto que da una señal química, que permita cuantificarlo.

Las técnicas más reportadas son la *quimioluminiscencia*, *espectrofluorometría* y *espectrofotometría* entre otros (para mayor información referirse al **anexo 1**). Los métodos reportados son relativamente sensibles y libres de interferencias, sin embargo, sufren de algunas desventajas comunes como el uso de equipo complicado, alto costo y la más importante, salvo aquellos donde se utiliza como elemento selectivo alguna enzima (catalasa o peroxidasa de rábano), no se verifican las pruebas que confirman que la señal se deba al analito de interés que son: la adición de catalasa y posterior adición de una solución estándar de peróxido de hidrógeno.

También se han desarrollado metodologías para la determinación de  $H_2O_2$  en pequeñas cantidades utilizando *técnicas electroquímicas*, entre los trabajos más notorios podemos citar los siguientes:

- El trabajo realizado por Swei A. et al en 1996 donde determinan  $H_2O_2$  utilizando cronoamperometría a 0.60 V con un electrodo de platino monitoreando la oxidación de  $H_2O_2$ , metodología probada en muestras biológicas. [19]
- Debido a los diferentes usos de este compuesto, existen numerosos tipos de muestras donde es necesario cuantificarlo, entre ellos podemos citar, el agua de alberca (por su uso como desinfectante); este analito se determinó por cronoamperometría a 0.67V con el uso de un arreglo de ultramicroelectrodos de platino conectados en paralelo, este dispositivo permite

---

cuantificar el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en un intervalo lineal de 0-150 mg/L, esta metodología fue desarrollada por A. Schwake et al. [20]

- Los metales de transición (hierro y cobre) son utilizados como electrocatalizadores, de ahí surge la propuesta de Garjonyte y Malinauskas de emplearlos para modificar la superficie del electrodo de platino con la finalidad de generar un sensor a peróxido de hidrógeno, que opera en un intervalo lineal de 0 a 8 mM; utilizando como técnica, la cronoamperometría. [21]
- También suele generarse oxígeno por acción enzimática de la catalasa o peroxidasa de rábano, el cual se determina usando el electrodo de Clark. [22]
- Fred Lacy en el Journal of Hypertension reportó la determinación de este analito empleando la cronoamperometría a un potencial de 0.65 V, potencial donde se observa la oxidación del peróxido de hidrógeno, se utiliza como electrodo indicador un sensor de platino que trabaja sin problemas en un intervalo lineal de 5-10 nM. [23]
- En un trabajo del año 2001 se describe el uso de la amperometría a 0.60 V usando microelectrodos de oro modificados con platino acoplados a un sistema de análisis en flujo (FIA) en un reactor tubular que contiene catalasa. El intervalo lineal va de 1-100  $\mu\text{M}$ , un RSD de 1% y un límite de detección de  $2.9 \times 10^{-7}$  M; metodología que fue probada en agua de lluvia. [24]
- En ese mismo año se reportó un electrodo de aluminio modificado con hexacianoferrato de manganeso que trabaja en un intervalo de concentraciones de  $6 \times 10^{-7}$  a  $7.4 \times 10^{-3}$  M y presenta un límite de detección de  $2 \times 10^{-7}$  M; este sensor muestra una estabilidad de 2 meses. [25]
- Aprovechando que los electrodos modificados tienen la posibilidad de modular la selectividad y sensibilidad de los sensores electroquímicos; Doménech y Alarcón determinan  $\text{H}_2\text{O}_2$  usando carbón vítreo como sustrato y elaboran electrodos modificados de composite con grafito, poliéster y zirconias monoclinicas dopadas con vanadio en una proporción de 0.5 a 15% mol. Este electrodo modificado tiene la característica de decrecer el sobrepotencial de reducción (de -1000 mV a -400 mV). Se emplea en un intervalo de 5 a 400  $\mu\text{M}$  de concentración y se obtiene un límite de detección de 0.9  $\mu\text{M}$ . [26]
- Transductores amperométricos a base de polimetilxilosano fueron propuestos por Mizutani et al. probados en un intervalo lineal de 50  $\mu\text{M}$ -0.6 mM. [27]

Debido al desarrollo de técnicas enzimáticas, cantidades traza de peróxido de hidrógeno pueden cuantificarse al utilizar la oxidación de un sustrato por una peroxidasa o a base de

---

---

moléculas medidoras, con lo cual se ha permitido el desarrollo nuevos métodos empleando los *biosensores*. Como ejemplos podemos citar:

- El sistema propuesto por Yabuki et al. consiste en un electrodo de carbón vítreo cubierto con una membrana de complejo de poli-ion y peroxidasa como mediador, observándose un tiempo de respuesta de 15 segundos, un límite de detección hasta  $0.5 \mu\text{M}$  y una respuesta lineal hasta de  $10 \mu\text{M}$  y con un tiempo de estabilidad de 1 mes; lo cual, lo hace un método muy rápido y sensible. [28]
- Baoxin Li de China propuso un sensor en flujo donde se usa hemoglobina como sustituto de la peroxidasa de rábano, encapsulada en una matriz de sol-gel, el cual fue probado en una muestra de agua de lluvia, obteniéndose un intervalo lineal  $6 \times 10^{-5}$  a  $4 \times 10^{-7}$  M, con un límite de detección de  $1.3 \times 10^{-7}$ , un tiempo de análisis de 1 minuto y un valor de RSD de 1.7%, este sensor puede ser utilizado 500 veces o durante un periodo de 1.5 meses. [29]

## 2.4 Validación

La validación de métodos analíticos es una parte fundamental en el desarrollo de una nueva metodología para la cuantificación de una especie; ya que es durante esta secuencia de pruebas y análisis, cuando el químico se da cuenta si el estudio, que está siendo evaluado sistemáticamente, cumple o no con los propósitos para los cuales fue diseñado.

La validación del método puede definirse como “el proceso por el cual queda establecido por estudios de laboratorio que la capacidad del método (en términos de parámetros analíticos) satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas”.

Los requisitos analíticos dependen de la aplicación del método y determinan los parámetros o criterios de calidad del método a utilizar para resolver el problema, éstos son de tipo estadístico o de tipo operativo/económico, ambos de carácter cuantizable; y de recursos y gestión de carácter no cuantizable; lo anterior se aprecia en la tabla 4. [30]

Tabla 4. Parámetros de calidad de un método.

CUANTIZABLES	ESTADÍSTICOS (Esenciales)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Exactitud</li> <li>- Precisión</li> <li>- Sensibilidad</li> <li>- Limite de detección</li> <li>- Estabilidad</li> </ul>
	ECONÓMICOS (a optimizar)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inversión</li> <li>- Gastos</li> <li>- Costos</li> <li>- Tiempo de ejecución</li> <li>- Grado de automatización</li> </ul>
NO CUANTIZABLES	RECURSOS	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Humanos</li> <li>- Instrumentales</li> <li>- Procedimientos</li> </ul>
	GESTIÓN	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Planificación</li> <li>- Muestras</li> <li>- Documentos</li> <li>- Evaluación</li> </ul>

La guía EURACHEM, 1998 titulada “The fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics” proporciona un esquema (**figura 4**) que relaciona estos requisitos analíticos con los parámetros de calidad que debe poseer el método seleccionado para la resolución de un problema.

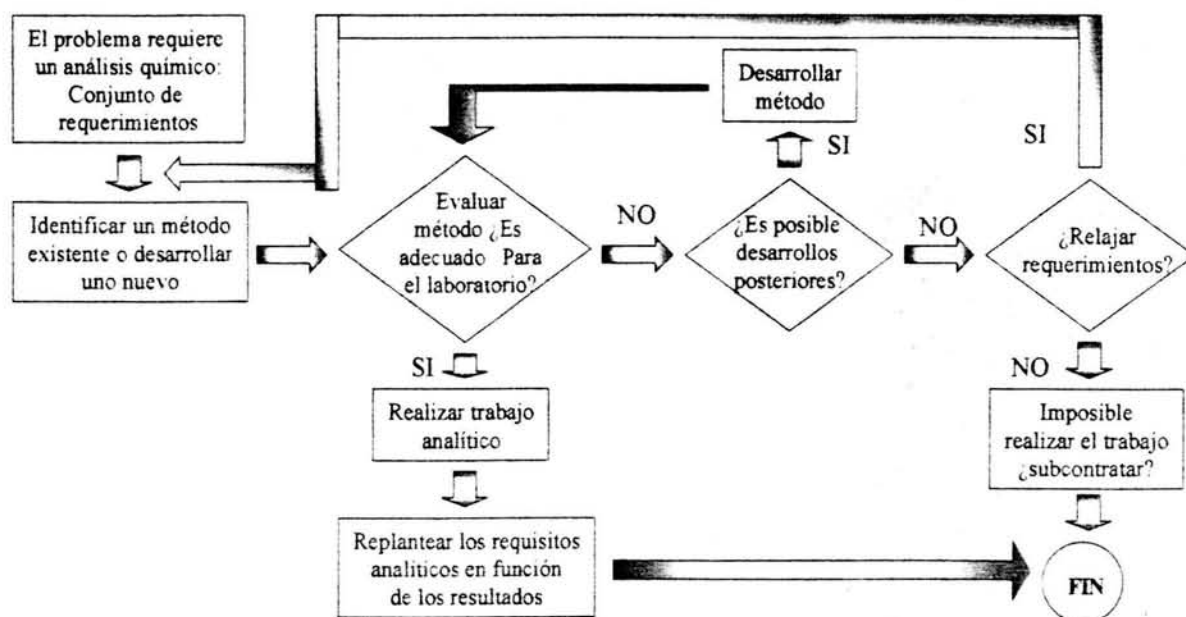


Figura 4. Elección, desarrollo y evaluación de métodos.

Sea cual sea la calidad de los datos disponibles para el método, la adecuación a la finalidad o propósito perseguido, “fit for purpose” será determinada por el funcionamiento del método cuando se usa por el analista designado con el material disponible.

Sin duda la fiabilidad de los resultados analíticos es quizá uno de los parámetros de calidad más valorado, para cual se busca que sean exactos y trazables.

La trazabilidad se define como la “propiedad del resultado de una medición o el valor de un estándar que consiste en que se pueda establecer el resultado previsible de su comparación directa con los patrones apropiados, generalmente nacionales o internacionales, mediante una cadena ininterrumpida de comparaciones reales, todas con incertidumbres conocidas”, en tanto que la exactitud se define como “la concordancia entre un resultado y el valor de referencia aceptado que implica una combinación de componentes aleatorios y un error sistemático común o componente de sesgo” y se expresa como términos de veracidad y precisión.

En las medidas físicas a diferencia de las medidas químicas la trazabilidad generalmente es un proceso directo, ya que prácticamente las primeras acaban trazándose a su respectiva unidad del sistema internacional (SI) y las segundas a una referencia aceptada que dista de ser la unidad del SI.

El paso clave para asegurar la trazabilidad en las medidas físicas será la etapa de calibración que se define como “el conjunto de operaciones que permiten establecer, en

determinadas condiciones experimentales, la relación que existe entre los valores indicados por el aparato de medida o por el sistema de medida, o por los valores representados por una medida materializada, con los valores obtenidos en la medida de un valor conocido" [31].

En medidas químicas la trazabilidad es la propiedad del resultado de una medición con el uso de referencias adecuadas generalmente en una sola comparación. Existen referencias de muchos tipos jerarquizadas de acuerdo a su nivel de trazabilidad y al valor de la incertidumbre que tienen asignada.

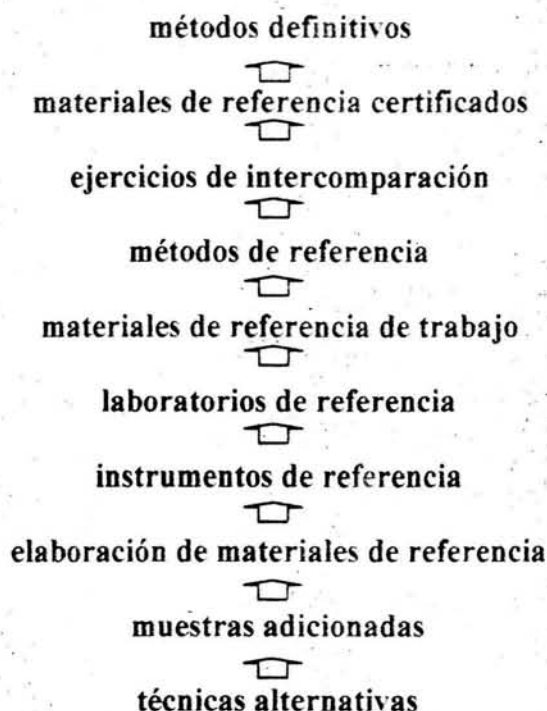


Figura 5. Jerarquía de referencias de acuerdo a la pirámide metrológica.

En la **figura 5** se observa que la mejor referencia es la que constituyen los métodos definitivos o absolutos; estos métodos son aquellos que por definición se pueden trazar directamente al mol como son: la volumetría, la coulombimetría, la espectrometría de masas con dilución isotópica, la gravimetría, los métodos coligativos y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

Las condiciones rigurosas o el reducido ámbito de aplicación son los motivos por los cuales se utilizan muy poco, razón por la cual se utilizan otros métodos como los materiales de

---

referencia certificados, los ejercicios interlaboratorio, los materiales de referencia, entre otros; pero sin olvidar que no siempre es necesario utilizar una referencia de nivel metrológico elevado (y generalmente de costo elevado) para verificar la trazabilidad de nuestros resultados.

Se ha mencionado que la trazabilidad de los resultados obtenidos mediante medidas físicas depende en gran parte de la calibración de los equipos con los que se mide, sin embargo, la calibración de aparatos e instrumentos de medida que intervienen en los procesos de medida químicos es importante, aunque en menor grado que en los procesos de medida físicos, dado que en los primeros existen muchos más factores que influyen en el resultado final, además los equipos han de calibrarse dado que sus respuestas generalmente no son estables con el tiempo debido a envejecimiento, deterioros, limpiezas inadecuadas, reacciones químicas, etc; debido a lo anterior es necesario realizar una operación de comparación de los equipos o sistemas de medida con los valores conocidos de una medida para garantizar que medimos igual que otros laboratorios y que los valores de nuestras medidas se mantienen con el paso del tiempo. [32]

Anteriormente definimos el concepto de calibración, pero es importante puntualizar que en medidas analíticas el concepto de calibración tiene un doble significado que comprende la calibración instrumental y la calibración analítica, y en esta última se relaciona la respuesta instrumental con la concentración del analito a determinar. [30]

Según el tipo de calibración los diferentes métodos analíticos se clasifican en:

- **Métodos absolutos:** la medida física se relaciona directamente con la cantidad de materia.
- **Métodos estequiométricos:** la calibración de un reactivo permite relacionar la cantidad de patrón con la cantidad de analito por un mecanismo químico.
- **Métodos comparativos:** en los cuales los valores obtenidos en las mismas condiciones experimentales, para una serie de patrones y para las muestras se relacionan entre sí a través de un factor o una función de calibración, normalmente mediante un modelo de línea recta.

El principal objetivo de la calibración es eliminar los errores sistemáticos, para lo cual deben establecerse programas y procedimientos de mantenimiento, ajuste y calibración de: aparatos, instrumentos y reactivos normalizados.

Los criterios para diseñar un programa de calibración son:

- **Objeto de la calibración e intervalo:** es necesario dar a conocer las limitaciones o casos en los que el procedimiento no es válido.

- 
- **Unidades y forma de presentación:** el resultado de una calibración es un factor o un gráfico, cuyas unidades y escalas están debidamente explicitadas, nunca deberán suponer condiciones por defecto.
  - **Registro o certificación:** todos los datos parciales y evidentemente los finales de la calibración deberán quedar registrados para cualquier verificación posterior.
  - **Frecuencia:** las normas sobre el tiempo máximo que debe transcurrir entre dos operaciones sucesivas de calibración, ajuste o mantenimiento debe depender de criterios claramente establecidos para cada aparato o sistema a calibrar y de la experiencia acumulada en cada laboratorio.
  - **Patrones de referencia y de trabajo:** patrón es el “valor de medición materializado, aparato o sistema de medida con el que se intenta definir, realizar, conservar, o reproducir una unidad física o bien uno o varios valores conocidos de una magnitud con el fin de que sirvan de comparación a otros elementos de medida” y la elección de éstos debe resolverla el científico por sí mismo en muchos casos.
  - **Trazabilidad:** deberá demostrarse documentalmente, a través de los datos originales, de los registros y certificados, y en definitiva, a través de los procedimientos normalizados de trabajo utilizados.
  - **Procedimiento:** se trata de realizar una serie de acciones en una secuencia determinada registrando los valores o actuando sobre algún dispositivo mecánico o electrónico del aparato. Los tres grupos de técnicas analíticas, establecidos según el procedimiento de calibración, corresponden a modelos diferentes:
    - **Procedimientos absolutos**
    - **Procedimientos estequiométricos**
    - **Procedimientos comparativos:** la mayoría de los procedimientos instrumentales utilizados para análisis químico son sistemas complejos, pues el acoplamiento entre la muestra y el dispositivo de medida, o el sensor que proporciona la señal, incluye una serie de operaciones a realizar en condiciones de trabajo muy estrictas. Ésta es la razón por la que en los sistemas de análisis complejos la matriz de los patrones es una variable tan importante como su concentración para conseguir garantizar su correspondencia con la muestra.
-



## 2.5 Fundamentos de electroquímica

Las mediciones electroquímicas en sistemas químicos han proporcionado numerosas ventajas frente a los métodos convencionales; en la actualidad se usan para obtener datos termodinámicos, en análisis a nivel de trazas, en la electrosíntesis de algún producto, pero sin lugar a duda la ventaja que sobresale, es el hecho de que permite el estudio de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos. De esta manera numerosos métodos electroquímicos se han desarrollado en las últimas décadas y la aplicación de dichos métodos requiere de la comprensión de algunos conceptos.

La electroquímica se puede definir como el estudio de los procesos de reacción que ocurren en las interfaces conductor - solución generados por una perturbación eléctrica externa o espontánea.

En una medición electroquímica debe haber por lo menos dos electrodos: electrodo de trabajo y electrodo de referencia, así como un electrolito, en ocasiones se emplea un electrodo auxiliar. En el electrodo de trabajo, también llamado electrodo indicador, la diferencia de potencial varía en función de los fenómenos que se lleven a cabo en la solución; en el electrodo de referencia la diferencia de potencial debe ser constante y no debe permitir el flujo de corriente, de tal suerte que permita la comparación de las condiciones entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia; y finalmente el electrodo auxiliar tiene por función la de cerrar el circuito. El electrodo auxiliar no afecta el comportamiento del electrodo de trabajo, generalmente se escoge un electrodo que no produce sustancias por electrólisis que pueden llegar a la superficie del electrodo de trabajo y causar interferencia.

En un trabajo electroquímico se estudian una colección de interfases denominada celda electroquímica.

Las celdas electroquímicas son de dos tipos, las celdas galvánicas y celdas electrolíticas (**figura 6**), en las celdas galvánicas las reacciones ocurren espontáneamente, los electrodos se conectan externamente por un conductor, este tipo de celdas se emplean con frecuencia para convertir la energía química en energía eléctrica como en las baterías y las celdas combustibles; en tanto que en las celdas electrolíticas o voltáicas las reacciones se efectúan por la imposición de un voltaje externo más grande que el potencial reversible de la celda y a diferencia de las anteriores se usan para llevar a cabo reacciones químicas al efectuar un gasto de energía

eléctrica, ejemplos de procesos son: la síntesis electrolítica, electrorefinamiento, electroplateado, entre otros.

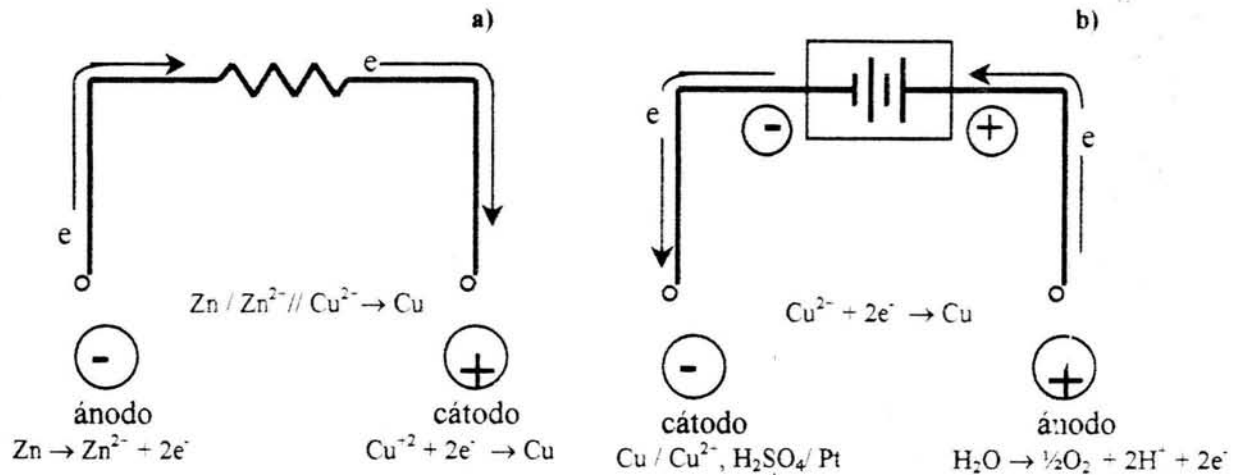


Figura 6. Tipos de celdas electroquímicas: a) galvánica y b) electrolítica.

Como ya se había mencionado, las reacciones electroquímicas tienen lugar en fase heterogénea, donde una fase, la solución, es un electrolito en el cual el transporte de la carga depende del movimiento de los iones y la segunda puede ser otro electrolito o un electrodo en donde el transporte depende del movimiento electrónico. Los electrodos pueden ser metales o semiconductores, sólidos como carbón vítreo, platino, oro, etc. o líquidos de alta densidad y tensión superficial, como el mercurio.

Si consideramos la reacción al electrodo



La corriente es gobernada por los procesos de:

- (1) Transferencia de masa.
- (2) Transferencia de electrones a la superficie del electrodo.
- (3) Reacción química antes o después de la reacción electroquímica, como son dimerizaciones, protonaciones, etc.
- (4) Reacciones de superficie como adsorción, desorción o electrodeposición (**figura 7**).

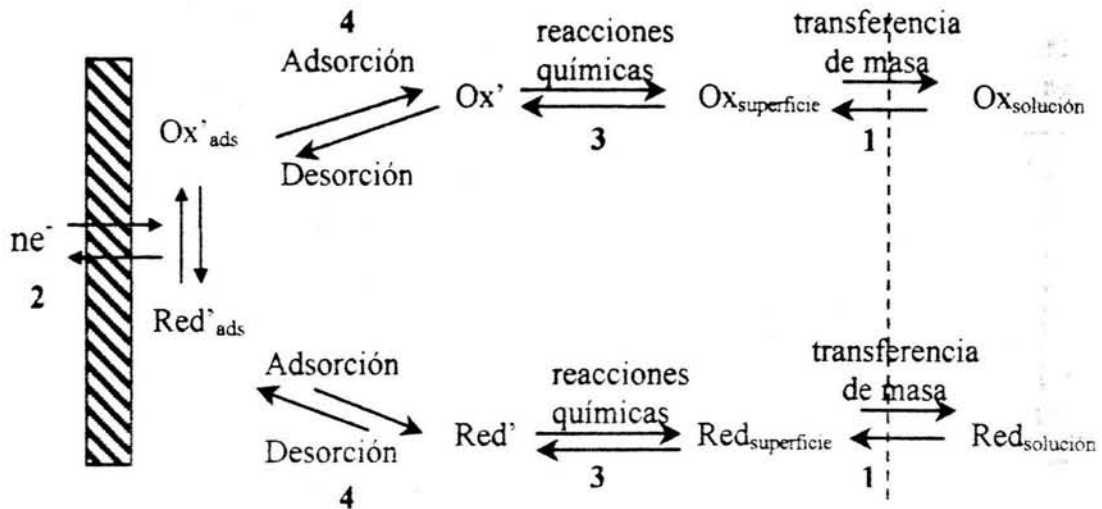


Figura 7. Procesos al electrodo.

La velocidad neta de una reacción al electrodo,  $v$ , está dada por la velocidad  $v_{mt}$ , a la cual las especies electroactivas llegan a la superficie del electrodo por el transporte de masa, el cual en su concepción más general, se puede definir como el movimiento de materia desde un lugar a otro; las formas en cómo se lleva a cabo son:

**Migración:** es el movimiento de partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico, es decir es un movimiento generado por un gradiente de potencial eléctrico.

**Difusión:** es el movimiento de las especies bajo la influencia de un gradiente de potencial químico, es decir un gradiente de concentración.

**Convección:** es un movimiento debido a fuerzas superficiales o de volumen que actúan sobre el líquido; se origina por la agitación de la solución, giro del electrodo de trabajo o temperatura entre otros y puede estar caracterizado por regiones inmóviles, flujo laminar y flujo turbulento.

Las contribuciones de estos mecanismos son aditivas ya que pueden actuar simultáneamente o en paralelo.

El transporte de masa al electrodo está gobernado por la ecuación de Nernst - Planck, que es la suma de las tres contribuciones: migración, difusión y convección, la cual escrita para el transporte de masa en una dirección a lo largo del eje  $x$  es:

$$J_i(x) = \underbrace{-D_i \frac{\partial C_i(x)}{\partial x}}_{\text{Contribución debida a: Difusión}} - \underbrace{\frac{z_i F}{RT} D_i C_i \frac{\partial \phi(x)}{\partial x}}_{\text{migración}} + \underbrace{C_i v(x)}_{\text{convección}}$$

La contribución debida al término de migración se reduce utilizando una sustancia no electroactiva en una concentración mucho mayor a la de la especie en estudio, denominada electrolito soporte que también sirve para minimizar la resistencia de la celda y en ocasiones decrece ó elimina los efectos de matriz.

De igual manera el aporte debido a la convección se puede controlar, si la disolución permanece estática, el aporte de masa sólo depende de la difusión y se le llama régimen de difusión pura (RDP), cuando se utiliza un electrodo giratorio o un electrodo goteante de Hg<sup>0</sup> entonces se trabaja en un régimen de difusión convectiva (RDC).

No hay que olvidar que los fenómenos que nos interesan se dan en las interfases y la interfase electrodo – solución ha mostrado experimentalmente un comportamiento de un capacitor que es un elemento de un circuito eléctrico formado de dos hojas metálicas separadas por un material dieléctrico y cuando se aplica un potencial a través del capacitor, la carga se acumula en las placas metálicas hasta que q satisface la ecuación:

$$q / E = C$$

En una solución el arreglo total de las especies cargadas y los dipolos orientados en la interfase metal – solución recibe el nombre de doble capa eléctrica y a un potencial dado está caracterizada por la capacitancia de la doble capa.

La doble capa eléctrica está compuesta de varias capas, la más cercana al electrodo, contiene moléculas de solvente y algunas veces iones o moléculas específicamente absorbidas, a esta capa más interna se le conoce como capa compacta de Helmholtz y el plano que pasa por el centro de los iones específicamente adsorbidos a la superficie del conductor se le llama plano interno de Helmholtz (IHP) ubicado a una distancia  $x_1$ , la segunda capa está formada por iones solvatados a una distancia  $x_2$  de la superficie del conductor, cuya interacción debida a la carga del conductor es electrostática, y el plano que pasa por el centro de estos iones se le conoce como plano externo de Helmholtz (OHP), finalmente, la capa difusa en la cual las especies se distribuyen en tres dimensiones desde el OHP hasta el seno de la solución (**figura 8**).

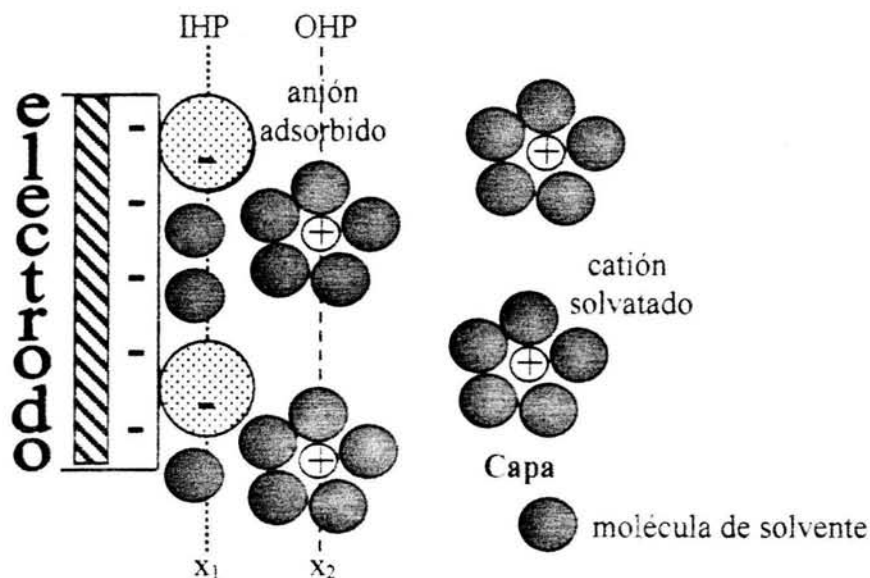


Figura 8. Modelo propuesto de la interfase electrodo – solución, región de la doble capa eléctrica.

Debido a que la doble capa eléctrica puede considerarse como un capacitor, el proceso de carga de la doble capa genera una corriente residual la cual es conocida como corriente capacitiva, de tal manera que la corriente total está dada por:

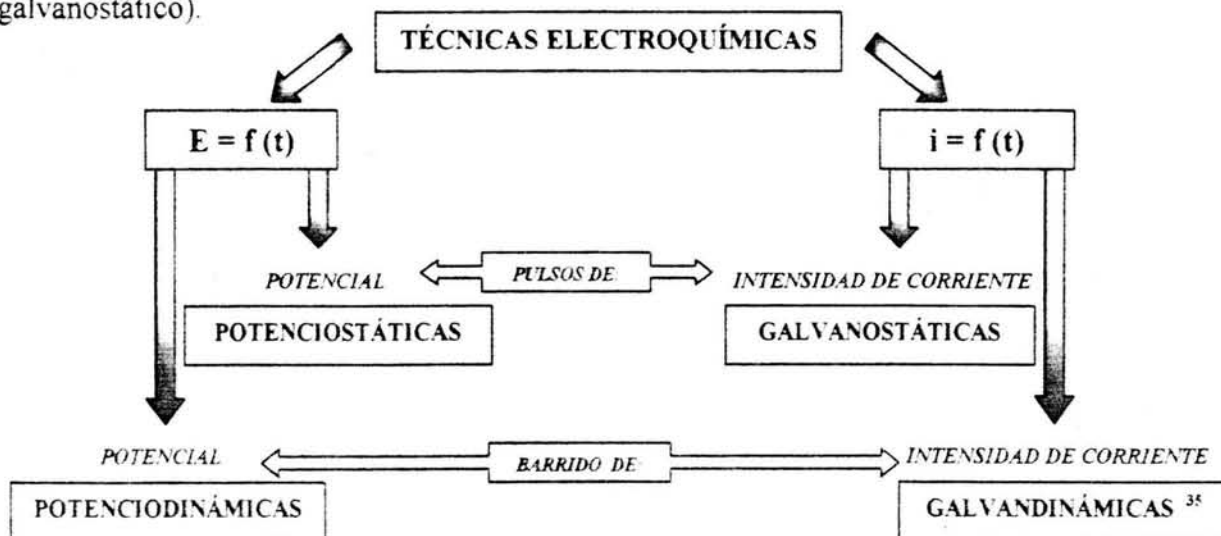
$$i_{\text{medida}} = i_{\text{capacitiva}} + \underbrace{i_{\text{difusión}} + i_{\text{migración iónica}} + i_{\text{convectiva}}}_{i_{\text{faradaica}}}$$

donde la corriente debida a los demás fenómenos electroquímicos se le conoce como corriente faradaica.

En una concepción muy general podemos decir que la información de un sistema electroquímico se obtiene al aplicar una perturbación eléctrica y observando los cambios en las características del sistema. Existen diferentes tipos de perturbaciones de acuerdo a la técnica electroquímica [33,34]

De acuerdo a los programas de perturbación, las técnicas electroquímicas son:  $E = f(t)$  e  $i = f(t)$ , es decir, mediante la imposición ya sea de potencial y de una intensidad corriente respectivamente; dicha imposición se puede realizar mediante pulsos de potencial (técnicas electroquímicas potenciostáticas) o de intensidad de corriente (galvanostáticas), además se

pueden realizar mediante un barrido de potencial (potenciodinámico) o de intensidad de corriente (galvanostático).



A continuación se muestran algunos ejemplos :

Técnica	Programa de perturbación	Señal generada
Polarografía DC		
Polarografía diferencial de pulsos		
Voltamperometría cíclica		
Cronoamperometría		

## 2.6 Técnica electroquímica a utilizar.

Debido a que cada vez se necesitan efectuar análisis a nivel de trazas, la sensibilidad y resolución son parámetros clave en el desarrollo de las técnicas analíticas.

Por otro lado las técnicas electroanalíticas constituyen un arma poderosa para la determinación de numerosos analitos, siempre que estos compuestos sufran reacciones electroquímicas (determinación directa) o participen en reacciones acopladas a una reacción electroquímica (determinación indirecta).

En el caso particular de la polarografía clásica se han desarrollado alternativas que superan algunas deficiencias, lo anterior parte del hecho de que los componentes de la intensidad de corriente son, como ya se mencionó anteriormente, la contribución faradaica y la capacitiva.

En polarografía clásica las señales interferentes dependen de la corriente capacitiva, la cual se asocia a la doble capa cargada del electrodo. Esta corriente desaparece rápidamente cuando hay un cambio en el potencial del electrodo de acuerdo a la ecuación:

$$i_{\text{capacitiva}} = 0.00567C_i(E_2 - E)m^{2/3}t^{-1/3}$$

en tanto que la corriente faradaica aparece a razón de  $t^{1/6}$ , lo anterior se ilustra en la **figura 9**.

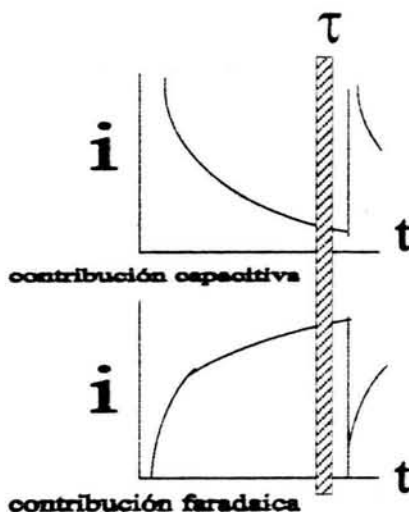


Figura 9. Contribuciones capacitiva y faradaica a la intensidad de corriente.

Como se puede apreciar si se muestrea a un tiempo  $\tau$ , tal que la contribución faradaica sea máxima y la capacitiva sea mínima, se puede aumentar la sensibilidad, debido a que las señales interferentes dependen fuertemente de la contribución capacitiva.

El éxito de lo antes mencionado se corrobora en la polarografía diferencial de pulsos y normal de pulsos.

### 2.7.1 Polarografía diferencial de pulsos

La Polarografía Diferencial de Pulsos fue introducida por Barker and Gardner en el año de 1960.

El programa de perturbación (**figura 10**) consiste en aplicar un pulso de potencial, con una amplitud desde 10 hasta 100 mV, durante un tiempo muy pequeño de la vida de la gota (5-100 msec), en tanto se efectúa un barrido de potencial a una velocidad de 2-100 mV/seg.

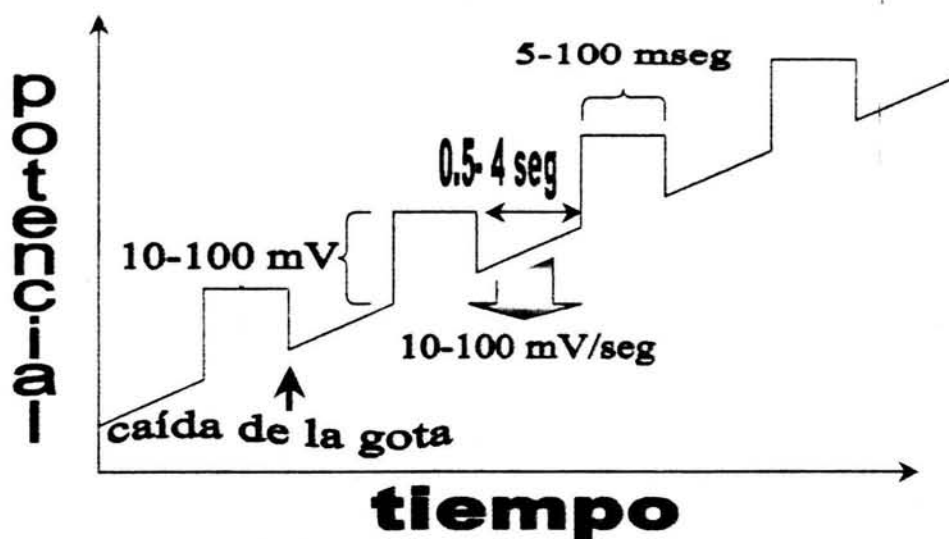


Figura 10. Programa de perturbación para la técnica de polarografía diferencial de pulsos.

La intensidad de la corriente es muestreada dos veces durante la vida de la gota, la primera a un tiempo  $\tau'$ , unas milésimas de segundo antes de aplicar el pulso de potencial y la segunda a un tiempo  $\tau$  durante el pulso aplicado y antes de que la gota caiga (**figura 11**).



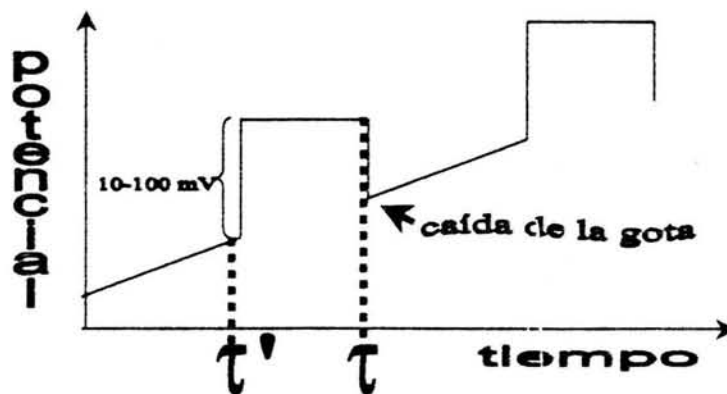


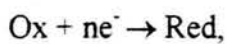
Figura 11. Tiempos de muestreo en polarografía diferencial de pulsos.

Así la técnica deriva su nombre en virtud de que la respuesta generada es una diferencia de la intensidad de corriente muestreada en función del potencial:

$$i(\tau) - i(\tau') = f(E)$$

Esta diferencia en la intensidad de la corriente se mantiene constante hasta que la siguiente lectura la reemplaza, dicha técnica se realiza bajo el régimen de difusión convectiva.

Para un sistema:



la forma de la respuesta generada es un pico como se muestra en la (figura 12); para explicar dicho comportamiento dividimos el gráfico en tres regiones.

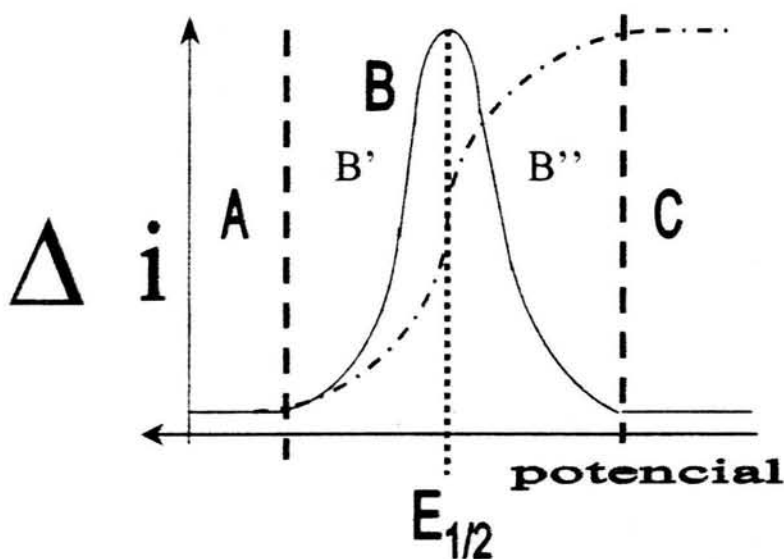


Figura 12. Respuesta generada por polarografía diferencial de pulsos.

---

En la región *A* se observa que la intensidad de corriente es constante, esto corresponde a que al inicio el potencial aplicado es más positivo que el valor del  $E_{1/2}$  por lo cual el pulso de potencial aplicado es insuficiente para promover el proceso faradaico, así que la diferencia entre la corriente muestreada antes y al final del pulso, es prácticamente cero [ $i(\tau) - i(\tau') = 0$ ].

Cuando el potencial es más negativo que  $E_{1/2}$ , la zona correspondiente a la corriente límite en polarografía clásica, la intensidad de corriente está limitada por la difusión de la especie que es reducida a una velocidad máxima, por lo que el pulso ( $\Delta E$ ) ya no incrementa la velocidad debido a que la forma oxidada es cero a la superficie del electrodo y tampoco la forma reducida puede ser reoxidada cuando el pulso de potencial se deja de aplicar, razón por la cual la diferencia de las intensidades de corriente medidas es nuevamente cero [ $i(\tau) - i(\tau') = 0$ ].

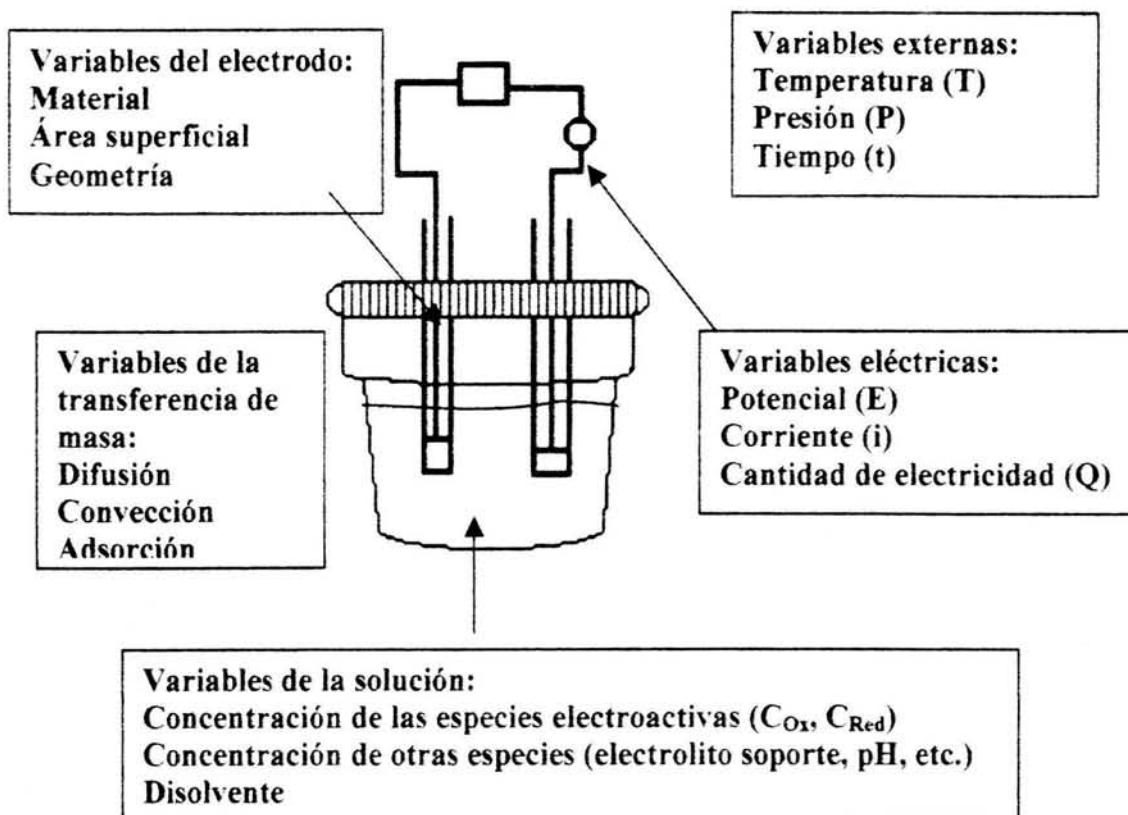
En la región *B* a valores cercanos a  $E_{1/2}$  la especie es reducida durante un período a una velocidad menor que la máxima debido a que la concentración al electrodo  $C_0(0,t)$  no es cero. En la región *B'*, se tiene que el potencial es más positivo que  $E_{1/2}$  pero lo suficientemente cercano a éste para que suceda la transferencia de carga y el pulso de potencial aplicado favorezca este proceso faradaico, en tanto que en la región *B''* el potencial es más negativo que  $E_{1/2}$  pero al mismo tiempo sin llegar a la máxima velocidad de la transferencia de carga por lo cual cuando se deja de aplicar el pulso de potencial la especie oxidada existe en la superficie del electrodo.

En esta técnica se tienen límites de detección de  $10^{-8}$  M, los cuales se establecen en función de la resistencia máxima que puede ser tolerada (respuesta capilar) o por condiciones químicas como el electrolito soporte y/o el pH, entre otros.

Las determinaciones analíticas se pueden realizar por estandarización interna, externa o adiciones patrón. [33,34]

## 2.7 Variables que afectan la velocidad de reacción

El comportamiento electroquímico del sistema a estudiar depende de diferentes variables, los parámetros modificables en un sistema electroquímico se presentan en la **figura 13**. [33]



---

### 3.0 OBJETIVOS

La determinación de  $H_2O_2$  ha cobrado interés debido a que dicho analito indica el daño celular debido a la presencia de especies reactivas de oxígeno. Se sabe que el  $H_2O_2$  es la especie más estable y por lo tanto, la apropiada para ser monitoreada, por lo cual se han desarrollado diversas metodologías con la finalidad de cuantificarla; sin embargo, en ocasiones los tratamientos de la muestra son drásticos lo que conlleva a su degradación. Por otra parte la puesta a prueba de metodologías mediante adición de catalasa y posterior adición de una solución estándar ha dado resultados desfavorables.

Debido a la importancia que tiene esta cuantificación en las áreas clínica y bioquímica es indispensable el desarrollo analítico de alternativas a la determinación de peróxido de hidrógeno con la evaluación de los parámetros que confirmen que la señal monitoreada se deba exclusivamente a la especie de interés.

Por lo cual, el objetivo general de este trabajo es el *Desarrollo de una metodología para determinar  $H_2O_2$  en muestras clínicas por polarografía diferencial de pulsos.*

En este trabajo se llevó a cabo la evaluación de la precisión, linealidad, exactitud y especificidad entre otros parámetros.

Para abordar este problema se cubrieron los siguientes objetivos particulares:

- Calibración del material volumétrico a fin de conocer las concentraciones reales y la incertidumbre asociada a las soluciones preparadas, además de una evaluación en la propagación de los errores aleatorios.
- Establecer las condiciones óptimas para llevar a cabo la determinación, por método directo e indirecto con la evaluación de los siguientes parámetros:
  - pH
  - Tipo de matriz
  - Agentes precipitantes de proteínas
  - Concentración de azida de sodio
  - Concentración de enzima
  - Concentración de  $H_2O_2$
  - Temperatura
  - Tiempo de reacción enzimática.

- Con base en los resultados obtenidos determinar  $H_2O_2$  en diferentes muestras (control y tratadas –inhibidas y estimuladas) con curvas de calibración adecuadas por ambos métodos.
- Finalmente, el establecimiento de un protocolo que permita llevar a cabo la determinación de  $H_2O_2$  en muestras de sangre.

## 4.0 PARTE EXPERIMENTAL

El trabajo experimental fue dividido en tres etapas, la primera fue la calibración del material volumétrico a utilizar, la segunda fue la evaluación de los parámetros para el establecimiento de las condiciones operatorias y finalmente la determinación del  $H_2O_2$  en muestras de animales control, estimulados e inhibidos en su producción de dicho analito.

### 4.1 Reactivos

Los reactivos usados fueron:

- $C_4H_{11}NO_3$  (Tris(hidroximetil)aminometano) p.a. – Pro Analysis Merck con un 0.001% de cloruros (Cl), 0.005% de sulfato ( $SO_4$ ), y 0.0005% de metales pesados (como Pb).
- HCl – Técnica Química con un porcentaje de ácido de 36.5 – 38%, nivel de impurezas en el caso de metales pesados (como Pb) 0.0001 % y Fe 0.0002 %.
- $KMnO_4$  (permanganato de potasio) - BAKER ANALYZED Reactivo según especificaciones de la ACS nivel de impurezas en lo que se refiere a materia insoluble 0.045%, cloruros y cloratos (como Cl) 0.005%, compuestos nitrogenados (como N) 0.003%, sulfatos ( $SO_4$ ) 0.018%.
- $H_2C_2O_4$  (ácido oxálico) – Técnica Química, Reactivo analítico con un porcentaje de materia insoluble de 0.005%, cloruros (Cl) 0.002%, sulfatos ( $SO_4$ ) 0.002%, calcio (Ca) 0.001% y metales pesados (como Pb) 0.0005%.
- $H_2O_2$  (Peróxido de hidrógeno) – Solución al 30 %, J.T. Baker con las siguientes especificaciones: Residuo después de la evaporación 0.0002%, cloruro (Cl) < 0.2 ppm, nitrato ( $NO_3$ ) < 5ppm, Fosfato ( $PO_4$ ) < 0.5 ppm, sulfato ( $SO_4$ ) < 3 ppm y amonio ( $NH_4$ ) < 2 ppm.
- Catalasa de hígado de bovino – Sigma con 2800 U/mg de sólido, 4000 U/mg de proteína; 1 U descompone 1  $\mu$ mol de  $H_2O_2$ /min a pH= 7.0 a 25°C si la concentración se encuentra de 10.3 a 9.2  $\mu$ mol/mL.
- $NaN_3$  (Azida de sodio) – Aldrich, reactivo analítico.
- $C_3H_6O_2$  (acetona) - Farmacia "PARIS", No. 535
- $C_2H_5OH$  (Etanol) – ALISA 96° g.L. sin desnaturalizar.

- 
- $\text{HNO}_3$  (ácido nítrico) – Mallinckrodt con un porcentaje de ácido de 70%, nivel de impurezas en el caso de metales pesados (como Pb) 0.0001 % y Fe 0.0002 %.
  - $\text{Hg}^\circ$  Hexadestilado
  - Fosfato
  - Fosfato
  - Amortiguador de referencia pH  $7.00 \pm 0.01$  a  $25^\circ\text{C}$ , solución de fosfatos de sodio y potasio de la marca HYCEL DE MÉXICO y
  - Amortiguador de referencia pH  $4.01 \pm 0.01$  a  $25^\circ\text{C}$ , solución de ftalato ácido de potasio de la marca  $\Sigma$  SIGMA DE MÉXICO.

Todas las soluciones fueron preparadas con agua destilada obtenida en el laboratorio, presentando una conductividad de  $0.375 \mu\text{S}/\text{cm}$ .

#### 4.2 La celda, los electrodos y aparatos

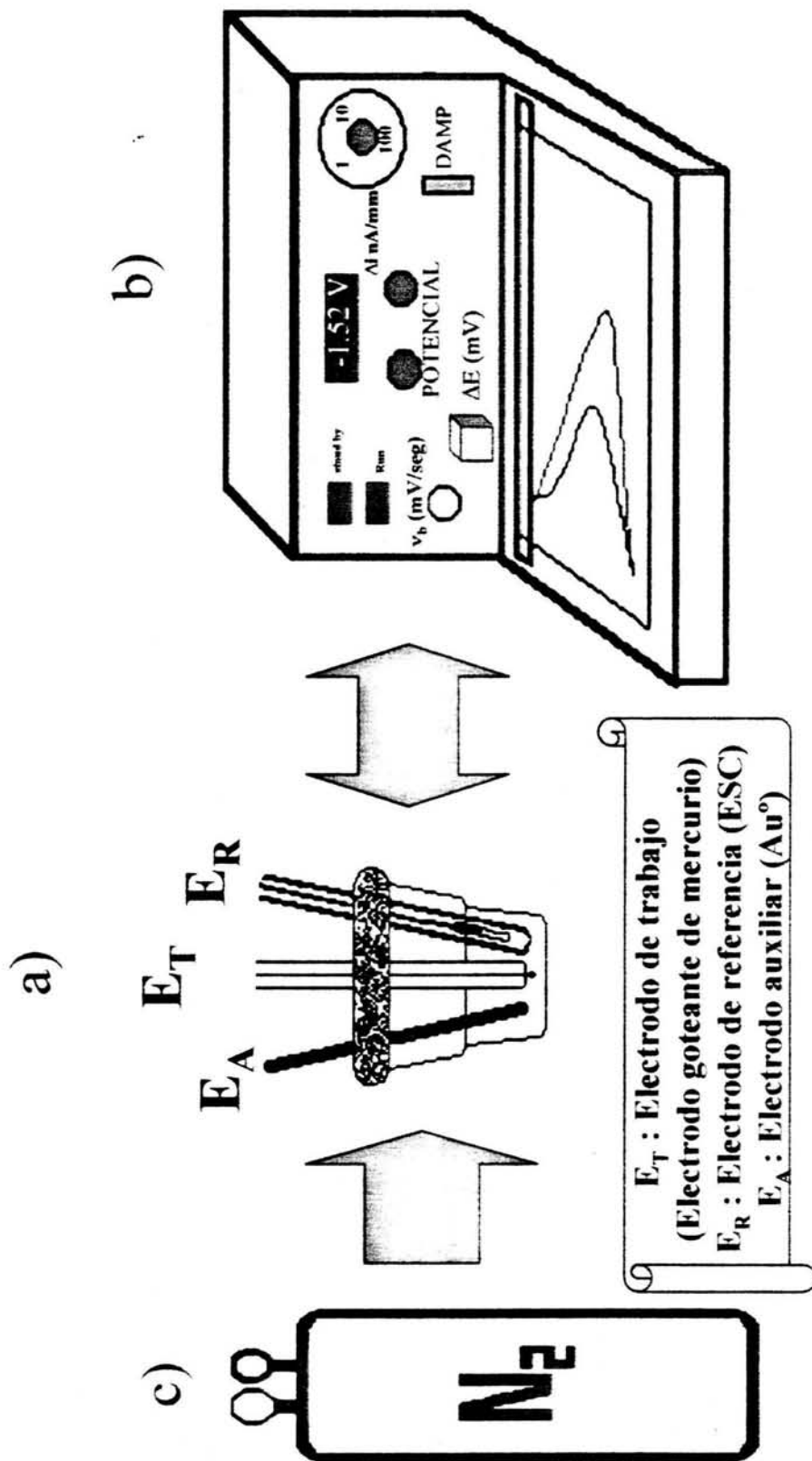
Se utilizó una celda electroquímica con una capacidad de 10 mililitros que se lavaba con ácido nítrico caliente 15 M y abundante agua destilada.

La determinación se llevó a cabo con un sistema de 3 electrodos: el electrodo de trabajo fue el electrodo goteante de mercurio (DME), el electrodo auxiliar fue un alambre de  $\text{Au}^\circ$  y los valores de potencial se refirieron al sistema  $\text{Hg}^\circ \mid \text{Hg}_2\text{Cl}_2 \downarrow \mid \text{KCl}$  de un electrodo de referencia.

Los electrodos fueron lavados con etanol, acetona y agua destilada e introducidos en una celda con un volumen de 2 mL que contenía el medio de reacción.

El sistema se conectó a un polarógrafo HMDE **METRHOM** VA Stand 663, que cuenta con un graficador integrado.

Se burbujeo  $\text{N}_2$ , previamente humedecido en el medio de reacción por 10 minutos y manteniendo una atmósfera de este gas a fin de evitar la interferencia de oxígeno.



Diseño del sistema para la determinación de peróxido de hidrógeno:  
a) celda electroquímica, b) polarógrafo con graficador integrado y c) tanque de  $N_2$



### 4.3 Establecimiento de las condiciones operatorias.

El DME (*Dropping Mercury Electrode*), el electrodo auxiliar y el electrodo de referencia  $\text{Hg}^{\circ}|\text{Hg}_2\text{Cl}_2|\text{KCl}$  fueron sumergidos en 2 mL de una solución de amortiguador, previamente burbujeada con  $\text{N}_2$  por 10 minutos, evaluando la señal debida a la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (método directo) o de  $\text{O}_2$  (método indirecto) al cambio de los siguientes parámetros: amortiguador (Tris 0.1mol/L pH=8 y fosfatos 0.05 mol/L pH=7), electrolito soporte, concentración de enzima e inhibidor de la enzima (azida de sodio), tipo de matriz (suero, plasma, plasma libre de proteínas con el uso de agentes precipitantes como: acetona, metanol y acetonitrilo, y finalmente la concentración de sustrato ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

### 4.5 Determinación de $\text{H}_2\text{O}_2$ en muestras clínicas control y tratadas.

De acuerdo a las condiciones experimentales establecidas en ambos métodos (método directo e indirecto) se procedió a realizar determinaciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en muestras control, estimuladas (con metilamina) e inhibidas (con hidralazina) en su producción de peróxido de hidrógeno. Utilizando un volumen de muestra de 500  $\mu\text{L}$ .

### 4.6 Programas de perturbación

#### 4.6.1 DETERMINACIÓN DIRECTA - Reducción de $\text{H}_2\text{O}_2$ a $\text{H}_2\text{O}$ por polarografía diferencial de pulsos

Se efectúa un barrido de potencial en las siguientes condiciones:

$$E_{in} = -0.65 \text{ V}$$

$$E_f = -1.4 \text{ V}$$

$$v_b = 10 \text{ mV/s}$$

$$\Delta E = 50 \text{ mV}$$

tiempo de goteo = 1 gota/seg

Sensibilidad de la intensidad de corriente: 1nA

#### 4.6.2 DETERMINACIÓN INDIRECTA - Reducción de $O_2$ a $H_2O_2$ por polarografía diferencial de pulsos

Efectuar un barrido de potencial en las siguientes condiciones:

$$E_{in} = 0.05 \text{ V}$$

$$E_f = -0.52 \text{ V}$$

$$v_b = 10 \text{ mV/s}$$

$$\Delta E = 50 \text{ mV}$$

tiempo de goteo = 1 gota/seg

Sensibilidad de la intensidad de corriente: 1nA

## 5.0 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

El conocimiento de los mecanismos que llevan al envejecimiento de las especies siempre ha interesado al hombre, pero desde la década de los 70's las investigaciones relacionadas con la teoría del estrés oxidativo, los radicales libres (RL) y los antioxidantes, han cobrado especial auge entre químicos, médicos, biólogos y físicos, quienes desean conocer mejor la oxidación celular, para lo cual se requiere la cuantificación en muestras biológicas tales como la sangre.

En la mayoría de la literatura este compuesto se ha determinado en matrices menos complejas, de ahí parte el interés de este trabajo, que se puede sintetizar en el desarrollo de una metodología para determinar concentración de  $H_2O_2$  en muestras de sangre y/o plasma.

Este estudio se llevó a cabo en dos etapas; en la primera etapa se establecieron las condiciones operatorias para cuantificar  $H_2O_2$  en muestras de plasma y en la segunda se realizó la aplicación de la metodología propuesta.

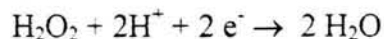
Todos los sistemas son referidos al Electrodo de Calomel Saturado (ECS).

### 5.1 Establecimiento de las condiciones operatorias y determinación de los parámetros estadísticos.

Las muestras de sangre, suero y plasma se obtuvieron de ratas Wistar macho proporcionadas por la Facultad de Medicina, para mayor información remitirse al **anexo 4**.

#### 5.1.1 Método directo

En la determinación directa se monitorea la reacción de reducción de peróxido de hidrógeno:



cual presenta la intensidad de pico máxima en  $-1.1$  V.

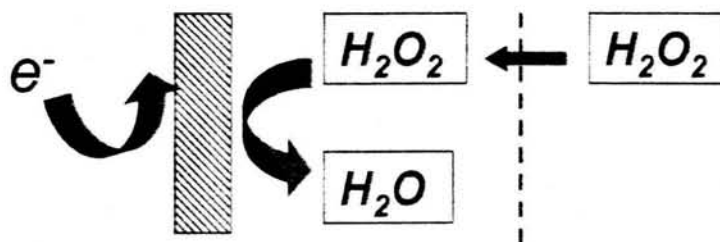
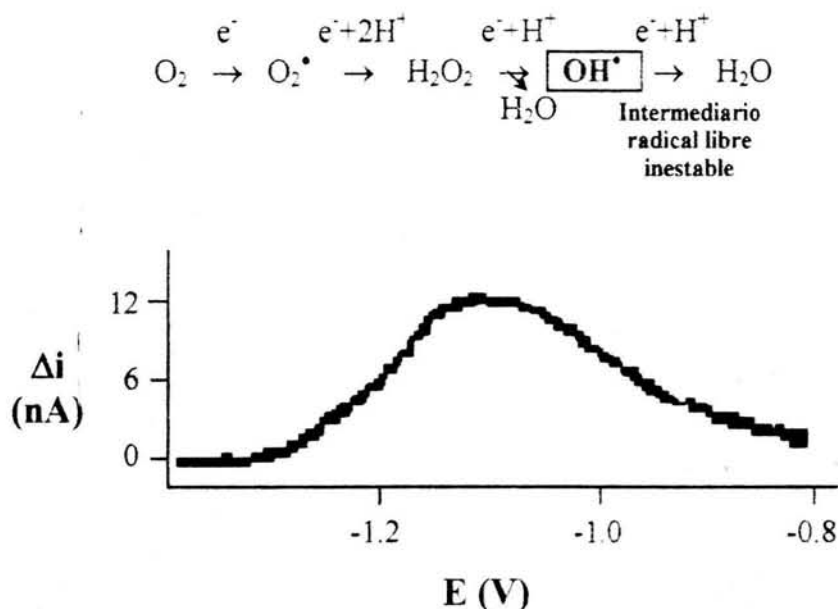


Figura 15 Fenómenos al electrodo en la determinación directa de  $H_2O_2$ .

En la **figura 15** se observan los fenómenos al electrodo del  $\text{H}_2\text{O}_2$  que consisten en la difusión del analito a la superficie del electrodo y la posterior reacción electroquímica de reducción del peróxido de hidrógeno vía 2 electrones a dos moléculas de agua. La señal de reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  obtenida se muestra en la **figura 16**, donde se aprecia que la señal es ancha debido a que el sistema es lento. Hay que remarcar que la reducción de peróxido a agua se lleva a cabo en dos etapas sucesivas que crean un intermediario radical libre altamente inestable, lo que permite que las reacciones acopladas de mayor velocidad se lleven a cabo debido al tiempo ventana de la técnica empleada.



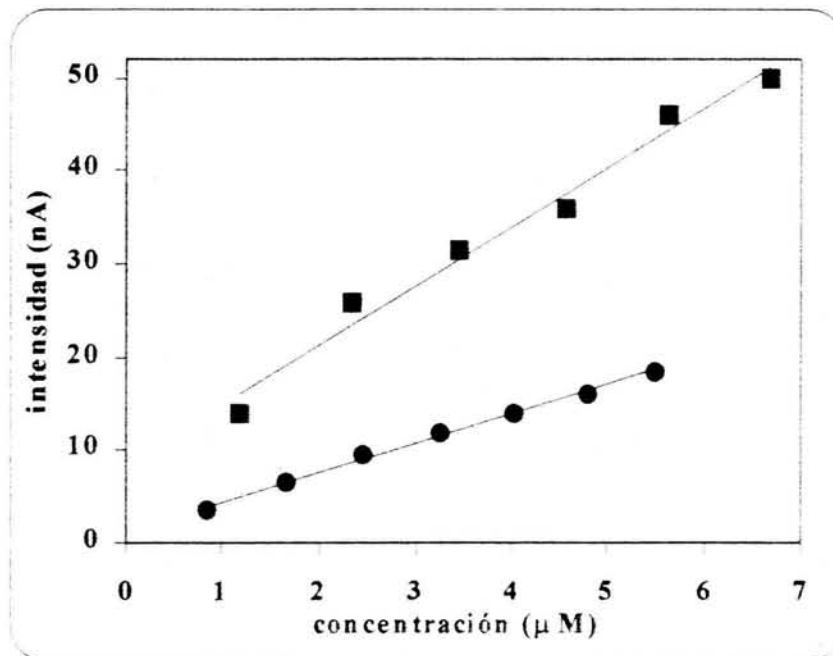
**Figura 16** Señal generada por la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en polarografía diferencial de pulsos a 10 mV/seg en amortiguador de Tris 0.1 M pH=8.

Este análisis se realizó de la siguiente manera: a 2mL de la solución amortiguadora (fosfatos o tris) se le adicionan 500  $\mu\text{L}$  de plasma o suero, a continuación se le adicionan 50  $\mu\text{L}$  de catalasa y se deja un tiempo de 5 minutos, en el cual se lleva a cabo la reacción enzimática, a este medio se adiciona 50  $\mu\text{L}$  de azida de sodio 0.1 M a fin de inhibir la acción catalítica de la enzima, posteriormente se realiza un burbujeo de  $\text{N}_2$  por 2 minutos y finalmente se realizan las correspondientes adiciones de una solución estándar de  $\text{H}_2\text{O}_2$  debidamente valorada (**anexo 5**) para la obtención de las curvas de calibración.

El primer parámetro a evaluar fue el amortiguador a utilizar. Para ello se evaluó el efecto de dos amortiguadores: Tris 0.1 M pH=8 y fosfatos 0.05 M pH=7, la elección de ambos se realizó con base en la cercanía de los valores de pKa al pH fisiológico.

Se obtuvieron las curvas de calibración que se muestran en la **figura 17**, en la cual se aprecia que pese a que el amortiguador de fosfatos pH=7 hace a la metodología más sensible, una pendiente de  $6.1_2 \pm 0.1_9$  contra  $3.1_4 \pm 0.08$ , la dispersión de los datos es mayor. Lo anterior probablemente se deba a que se presenta un fenómeno de adsorción de los fosfatos a la superficie del electrodo, además de que las impurezas de los reactivos utilizados para la preparación del amortiguador de fosfatos estén interfiriendo con el estudio.

Además el dominio de electroactividad es menor en el medio de fosfatos ( $\approx 70$  mV) con respecto al dominio obtenido en el amortiguador de Tris y hay que recordar que la señal de reducción es ancha y cercana a la barrera catódica (**figura 18**). Tomando en cuenta lo antes mencionado, se tomó de decisión utilizar amortiguador de Tris 0.1M pH=8 a fin de abrir el dominio de electroactividad y tener una señal de reducción de peróxido de hidrógeno bien definida.



**Figura 17** Efecto del amortiguador en la determinación del  $H_2O_2$   
 ■ amortiguador de fosfatos 0.1 M pH=7,  $\Delta i = 6.1 \pm 0.2 [H_2O_2] - 9.0 \pm 0.2$ ,  $r^2 = 0.9870$  y  
 ◆ amortiguador de Tris 0.1M pH=8,  $\Delta i = 3.14 \pm 0.08 [H_2O_2] - 0.16 \pm 0.09$ ,  $r^2 = 0.9985$ .

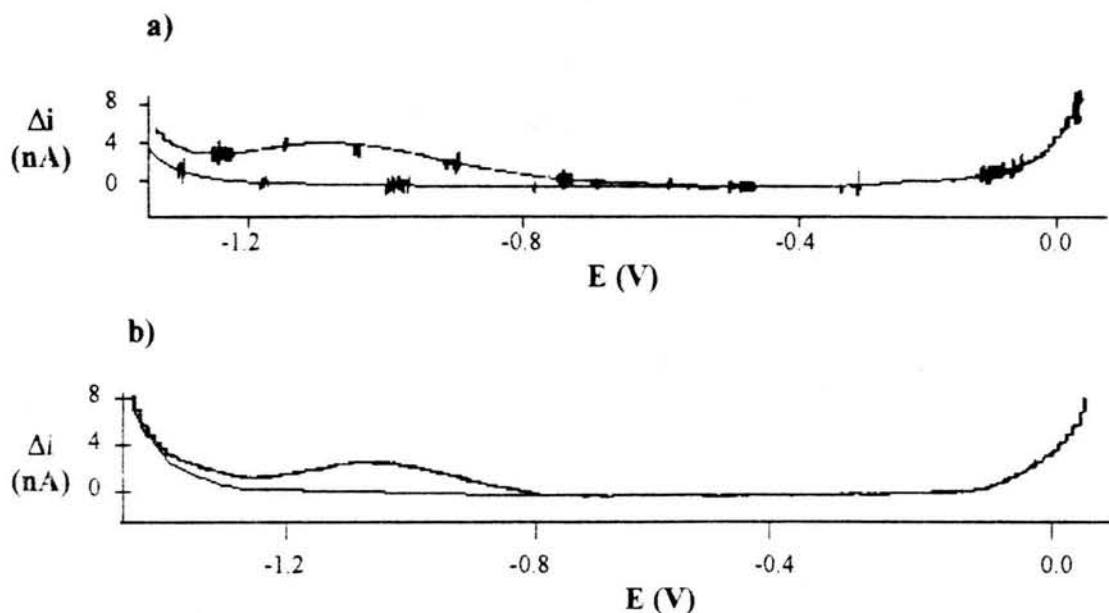


Figura 18 Señal de reducción de peróxido de hidrógeno y dominios de electroactividad en una matriz de suero y amortiguador de a) fosfatos 0.1M pH=7 y b) Tris 0.1M pH=8 a 10 mV/seg.

Para evaluar el efecto de la matriz se ensayaron diferentes tipos: sangre, plasma, suero y plasma utilizando diferentes agentes precipitantes como metanol, acetona (que simbolizaremos como plasma-metanol y plasma-acetona respectivamente), acetonitrilo y ácido tricloroacético; con este último se observa que la señal de reducción del  $H_2O_2$  es de gran intensidad, lo que impide tener una señal clara y definida; cuando se usa acetonitrilo no se observa ninguna señal de reducción.

Las curvas de calibración obtenidas se muestran en la **figura 19**.

Las ecuaciones de las rectas obtenidas se presentan en la **tabla 6**. Como se puede apreciar las ecuaciones para amortiguador de Tris, plasma, plasma-metanol y plasma-acetona son muy parecidas entre sí. A pesar de que se puede utilizar un método de adiciones estándar para efectuar la determinación utilizando una matriz de suero, con lo cual se evita el tratamiento de la muestra que pudiera conllevar a su pérdida; el burbujeo del  $N_2$  para desplazar el oxígeno provoca una espuma intensa, que puede ocasionar la pérdida de la muestra por adherencia de la solución a las paredes de la celda.

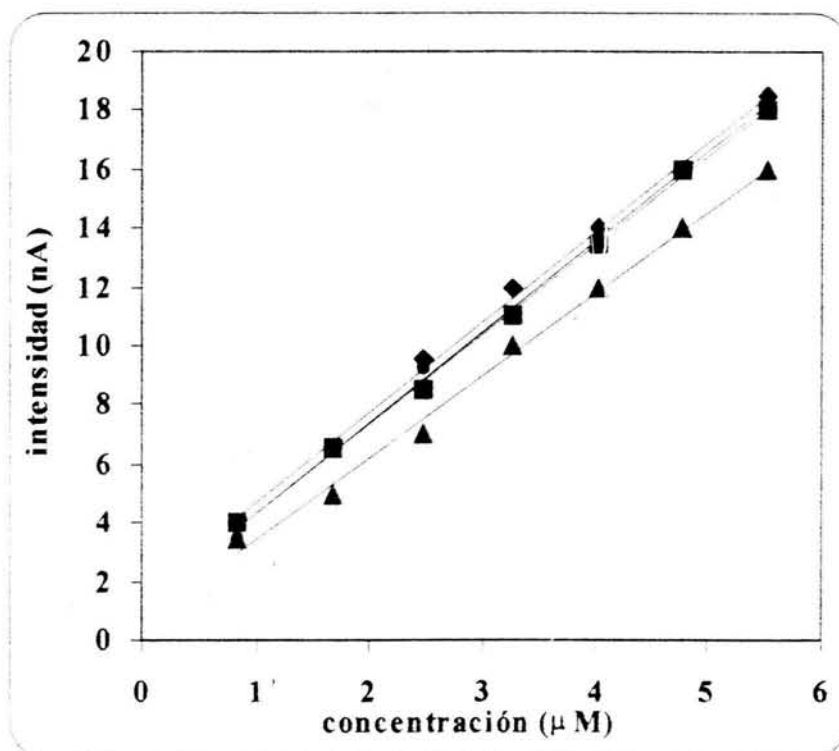


Figura 19 Efecto del tipo de matriz en la curva de calibración para la determinación del  $H_2O_2$   
 ◆ amortiguador de Tris pH=8, ■ Tris pH=8 + plasma, ▲ Tris pH=8 + suero, ◆ Tris pH=8 + plasma-metanol  
 y • Tris pH=8 + plasma-acetona.

Tabla 6 Ecuaciones de las rectas de calibración y sus coeficientes de correlación obtenidos en las matrices evaluadas.

TIPO DE MATRIZ	ECUACIÓN	$r^2$
Amortiguador de Tris 0.1 M pH=8	$\Delta i = 3.08 \pm 0.09 [H_2O_2] - 1.5 \pm 0.1$	0.9975
Tris 0.1 M pH=8 + plasma	$\Delta i = 3.0 \pm 0.1 [H_2O_2] - 1.2 \pm 0.1$	0.9985
Tris 0.1 M pH=8 + suero	$\Delta i = 2.8 \pm 0.2 [H_2O_2] - 0.7 \pm 0.1$	0.9945
Tris 0.1 M pH=8 + plasma-metanol	$\Delta i = 3.09 \pm 0.07 [H_2O_2] - 1.2 \pm 0.1$	0.9967
Tris 0.1 M pH=8 + plasma-acetona	$\Delta i = 3.09 \pm 0.09 [H_2O_2] - 1.4 \pm 0.1$	0.9958

En la **tabla 7** se muestra el resultado de la prueba estadística que nos ayudó a evaluar el efecto de utilizar diferentes tipos de matrices. Se observa que la pendiente se modifica

significativamente (un valor superior al crítico = 2.31) cuando se utiliza suero, en contraste con los valores de la pendiente del resto de las matrices en donde no se aprecian diferencias significativas cuando se comparan con aquella del amortiguador. Hay que remarcar que aunque el plasma presenta una curva de calibración semejante a las obtenidas con metanol o acetona se presenta la desventaja, como ya se mencionó, de que es ligeramente difícil controlar el burbujeo de  $N_2$  debido a la presencia de proteínas que provocan una espuma intensa, ya que sólo se han eliminado aquellas involucradas en el mecanismo de coagulación de la muestra. Lo anterior muestra que, las mejores opciones son la utilización de plasma con la precipitación de proteínas usando metanol y acetona.

**Tabla 7** Evaluación del efecto de matriz por comparación de las pendientes de las curvas de calibración.

Parámetro: Tipo de matriz	Pendiente (nA/ $\mu$ M)	Desviación estándar	Valor de $t_{\text{obtenido}}$ $\alpha = 0.05$	Valor de $t_{\text{critico}} = 2.31$ $\alpha = 0.05$
Amortiguador Tris 0.1M pH=8	3.0 <sub>8</sub>	0.1 <sub>0</sub>	0.6074	
Plasma	3.0 <sub>3</sub>	0.1 <sub>3</sub>	3.3838	
Suero	2.7 <sub>8</sub>	0.1 <sub>5</sub>	0.1719	
Plasma - metanol	3.0 <sub>9</sub>	0.0 <sub>7</sub>	0.1026	
Plasma - acetona	3.0 <sub>9</sub>	0.0 <sub>9</sub>		

Sabemos que la exactitud se expresa en términos de veracidad (proximidad al valor real) y precisión (dispersión del resultado), debido a que no conocemos el valor de referencia de la propiedad que estamos analizando emplearemos el concepto de trazabilidad.

Como ya se mencionó, no siempre es necesario utilizar una referencia de nivel metrológico elevado para garantizar la trazabilidad en una medida química, este parámetro también puede verificarse a través del porcentaje de analito recuperado, es decir, la relación entre la cantidad encontrada y la cantidad adicionada, la adición puede hacerse a uno o varios niveles de concentración. Aprovechando esta situación, analizamos la fracción recobrada en cada caso.

Dado que las mejores alternativas resultan ser el plasma libre de proteínas con acetona (plasma-acetona) y con metanol (plasma-metanol) en la **figura 20** se exhibe la evaluación de la



fracción recuperada, cuyo valor es la pendiente de la recta, tomando como base la señal obtenida en el amortiguador de Tris 0.1M pH = 8.

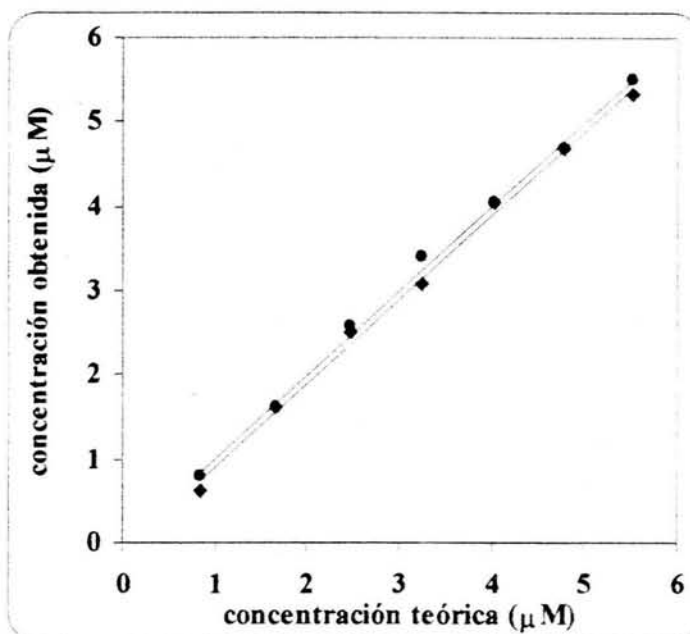


Figura 20 Fracción recuperada en Tris 0.1M pH=8,  $v = 10$  mV/seg,  
 ■ plasma-acetona,  $\Delta i = 0.998 \pm 0.009$  [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] -  $0.054 \pm 0.005$ ,  $r^2 = 0.9987$  y  
 ◆ plasma metanol,,  $\Delta i = 0.99 \pm 0.01$  [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] -  $0.2 \pm 0.1$ ,  $r^2 = 0.9956$ .

A continuación se compararon las pendientes obtenidas con la unidad y se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 8, con lo cual se pretende evaluar si existen diferencias significativas entre la unidad y valor respectivo.

Tabla 8 Evaluación del porcentaje de recobro por comparación de los valores de la pendiente de las curvas de calibración con la unidad.

Tipo de matriz	Pendiente (nA/µM)	Desviación estándar	Valor de $t_{obtenida}$ $\alpha = 0.05$	Valor de $t_{critica} = 2.78$ $\alpha = 0.05$
Plasma - acetona	0.99 <sub>8</sub>	0.01 <sub>0</sub>	0.3266	
Plasma - metanol	0.99 <sub>6</sub>	0.01 <sub>3</sub>	0.6770	

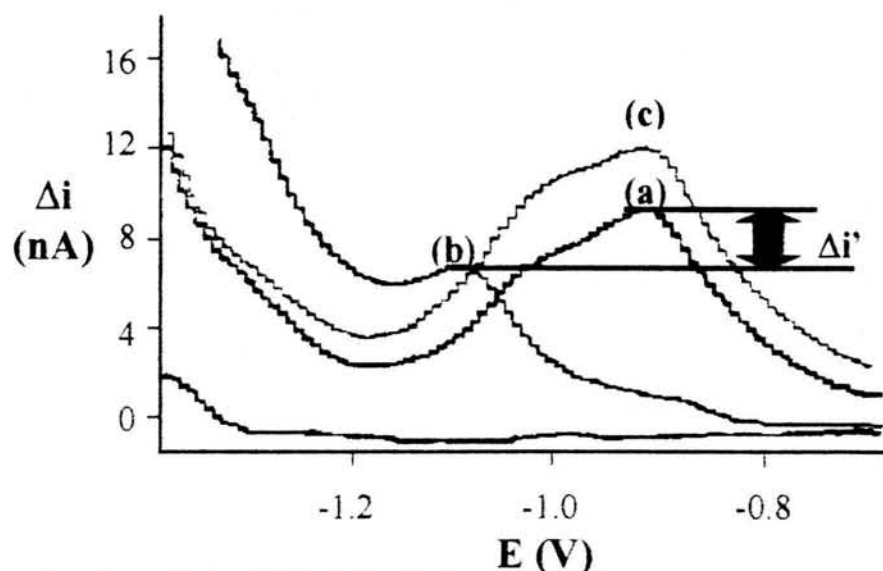
Como se puede apreciar los valores obtenidos son menores al valor crítico, lo cual sugiere que ambas matrices estadísticamente no presentan diferencias significativas.

Ahora se comparan los valores de la ordenada al origen con cero, los resultados se muestran en la tabla 9.

**Tabla 9** Evaluación del porcentaje de recobro por comparación de los valores de la ordenada al origen de las curvas de calibración con cero.

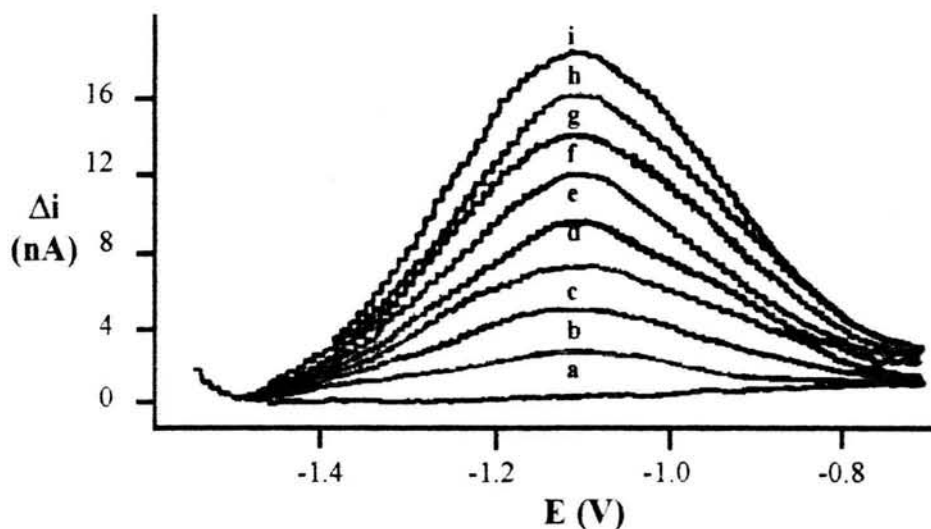
Tipo de matriz	ordenada al origen (nA)	Desviación estándar	Valor de $t_{obtenida}$ $\alpha = 0.05$	Valor de $t_{critica} = 2.78$ $\alpha = 0.05$
Plasma - acetona	0.053 <sub>8</sub>	0.001 <sub>9</sub>	2.75	
Plasma - metanol	0.277 <sub>0</sub>	0.004 <sub>7</sub>	9.06	

En la tabla 9 podemos apreciar, que cuando usamos plasma – metanol, el valor de  $t_{obtenido}$  es mayor que el crítico, por lo que se concluye que el valor de la ordenada al origen si difiere significativamente de cero, lo anterior podemos atribuirlo a que se dificulta la toma de la muestra en este tipo de matriz con respecto a aquella que se precipita utilizando acetona, debido a que el mecanismo de precipitación es diferente; lo anterior queda de manifiesto en la forma de la señal. Como se puede apreciar la señal es más ancha y presenta una deformación, de un pico a dos (a), posteriormente se realiza la adición de la enzima y en el registro se observa una disminución y un desplazamiento hacia potenciales más catódicos(b), finalmente para corroborar que la señal se deba a la presencia de  $H_2O_2$  se realizó una adición de una solución estándar del analito y se aprecia un incremento en la señal debida a la reducción de este compuesto (figura 21). Por lo cual decidimos usar acetona como el agente precipitante, además de que auxiliándonos de una prueba estadística se corrobora que el valor de la pendiente es más cercano a la unidad y por tanto el porcentaje de recobro está próximo a 100.

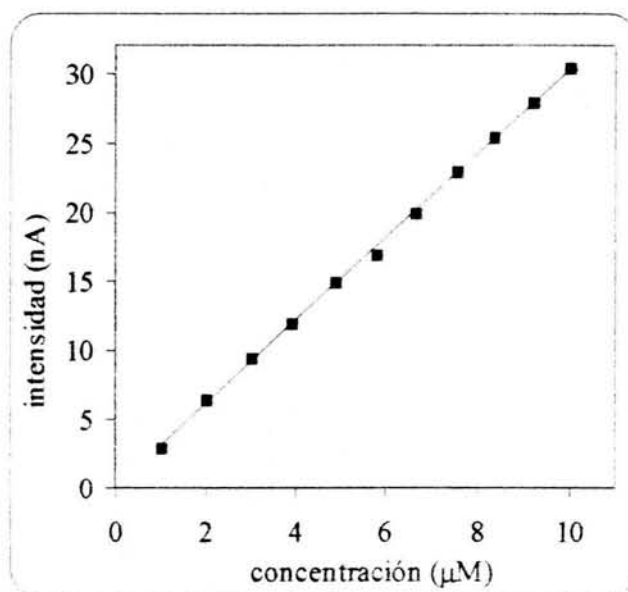


**Figura 21** Señal de reducción de  $H_2O_2$  en Tris 0.1M pH=8 en una matriz de plasma – metanol, a) muestra, b) muestra + enzima (catalasa) y c) muestra + enzima + azida de sodio + 50  $\mu$ L de solución estándar de  $H_2O_2$ , y  $\Delta i'$  se atribuye a la concentración de  $H_2O_2$  en la muestra.

El patrón de la curva de calibración obtenida por este método se muestra en la **figura 23**, donde se observa que el valor del potencial al que se tiene la mayor diferencia entre los valores de  $\Delta i$  es en  $-1.1$  V y la respuesta lineal se aprecia en la **figura 24**.



**Figura 23** Polarogramas típicos de una curva de calibración obtenida por método directo en un Tris 0.1 M pH=8, con adiciones de una solución 0.1 mM de  $H_2O_2$ : a) blanco, b) 25  $\mu$ L, c) 50  $\mu$ L, d) 75  $\mu$ L, e) 100  $\mu$ L, f) 125  $\mu$ L, g) 150  $\mu$ L, h) 175  $\mu$ L y i) 200  $\mu$ L.



**Figura 23** Curva de calibración de  $H_2O_2$  en Tris 0.1 M pH=8 utilizando una matriz de plasma-acetona obtenida por método directo.

Anteriormente la linealidad se verificó por el valor del coeficiente de correlación lineal, pero ahora se evaluará aplicando la prueba de rachas de Wald-Wolfowitz (prueba no paramétrica) para verificar si los resultados, que se ajustan a un modelo de línea recta – de

acuerdo al valor de  $r^2$  - aparecen en una secuencia aleatoria; para lo cual primero se evalúa si en estos resultados hay una tendencia y posteriormente se obtuviera el intervalo de linealidad.

En el anexo 6 se muestra el análisis de residuos que nos permitieron evaluar si los resultados obtenidos se pueden representar mediante un modelo lineal.

En la tabla 10 se resumen los parámetros para 12, 11 y 10 observaciones.

**Tabla 10 Resumen de los parámetros en la prueba de Wald-Wolfowitz. [37]**

número de observaciones	N (negativos)	M (positivos)	número de rachas observado	número de rachas teórico
12	5	7	7	4-10
11	4	7	6	3
10	4	6	6	3-8

Como se puede apreciar, el número de rachas observado se encuentra dentro del intervalo de rachas teórico y por tanto podemos concluir que para cualquiera de los tres casos los datos se ajustan a un modelo lineal, debido a que la secuencia de signos + y - es aleatoria.

En el anexo 7 se muestran el resultado de la suma de los cuadrados de los residuos para 10, 11 y 12 observaciones, lo anterior nos permitirá establecer el intervalo lineal de trabajo.

A estos valores se les aplicó una prueba estadística para saber si la tendencia de los valores de los residuos sugiere que el último residuo difiere significativamente del promedio, y por tanto está fuera del intervalo lineal. (tabla 11)

**Tabla 11 Evaluación del intervalo lineal de las curvas de calibración para 10, 11 y 12 observaciones.**

n	11	10	9
promedio	0.0831	-0.0123	-0.0126
desviación estándar	0.3084	0.2763	0.2889
$t_{\text{obtenido}}$	5.9545	-0.0741	-0.0705
$t_{\text{crítico}}$	2.20	2.23	2.26

Como se aprecia, cuando se compara el promedio de 10 y 9 observaciones con el último valor residual, el valor obtenido de  $t$  es menor que el valor crítico, por lo cual se concluye que el

intervalo lineal termina en la observación décimo primera y por tanto a una concentración de  $9.99 \mu\text{M}$ .

Ahora, empleando la definición de:

$$y_1 = y_B + 3\sigma_B \text{ [37]}$$

donde  $y_1$  = límite de detección o límite de cuantificación.

$y_B$  = ordenada al origen

$\sigma_B$  = desviación estándar de la ordenada al origen,

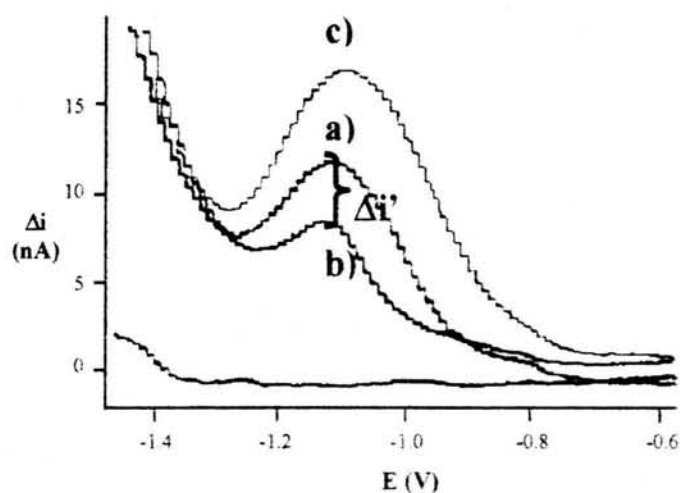
encontramos para el límite de detección un valor de  $0.0270 \mu\text{M}$ , empleando la definición de:

$$y_1 = y_B + 10 \sigma_B \text{ [37]},$$

se encontró un valor de  $0.0900 \mu\text{M}$  y finalmente empleando 1.5 veces el valor de la desviación estándar de B se calculó el límite de decisión el cual tiene un valor de  $0.0135 \mu\text{M}$ .

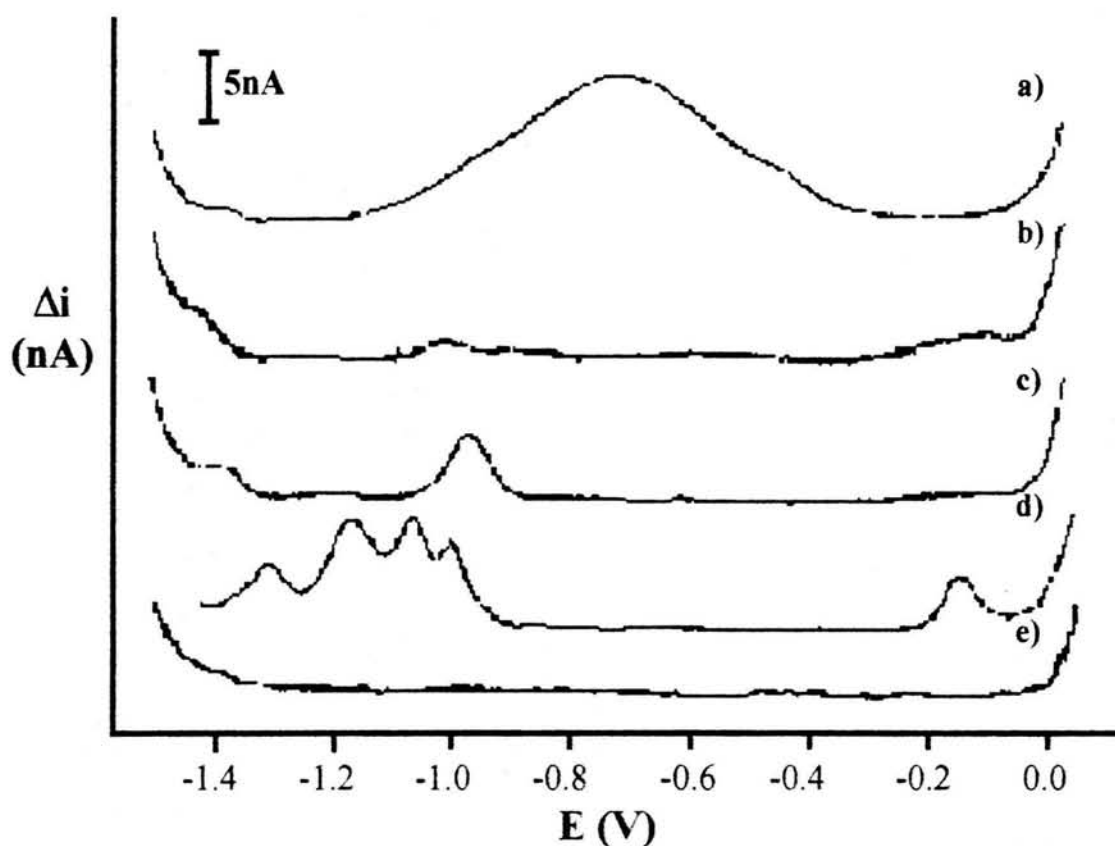
Por lo cual podemos establecer que el intervalo de linealidad en el método directo va desde  $0.09$  hasta  $10.00 \mu\text{M}$ .

Para evaluar la selectividad se realizó una adición de la enzima catalasa a la muestra (a), por lo cual la intensidad en la señal disminuye (b), lo anterior debido a que dicha enzima lleva a cabo una reacción redox con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  para generar  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , después de 5 minutos se realiza una adición de azida de sodio para inhibir la enzima después de lo cual se efectuó una adición del estándar (c), obteniéndose una respuesta como la que se muestra en la **figura 24**, en donde se aprecia una diferencia ( $\Delta i'$ ), la cual es atribuible a las variaciones en la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



**Figura 24** Respuesta de la determinación directa de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de una muestra plasma-acetona de una muestra, en amortiguador de Tris  $0.1\text{M}$   $\text{pH}=8$ ; cuya concentración fue de  $15.1 \pm 0.22 \mu\text{M}$  obtenida por interpolación en una curva de calibración; a) muestra, b) muestra + enzima y c) muestra + enzima + adición estándar.

Como se puede apreciar la señal no llega totalmente a cero, lo cual podemos atribuirlo a que los reactivos: heparina, anestesia, metilamina e hidralazina, utilizados en el tratamiento de los animales presentan una señal cercana a la de la reducción del peróxido de hidrógeno cuando se efectúa el barrido en sentido catódico (**figura 25**), sin embargo ninguno de estos analitos reacciona con la catalasa, con lo cual se garantiza que la diferencia entre las señales de la muestra y la posterior adición de la enzima se deba a la presencia de  $H_2O_2$ , cabe señalar que en todos los casos se obtuvieron dominios de electroactividad limpios (**figura 25-e**).



**Figura 25** Polarogramas obtenidos al efectuar un barrido en sentido catódico de los reactivos empleados en el tratamiento de los animales en un medio de Tris 0.1 pH=8, a) anestesia, 20 $\mu$ M; b) heparina, 5 $\mu$ M; c) metilamina, 10 $\mu$ M; d) hidralazina, 10 $\mu$ M y e) dominio.

Finalmente el parámetro a evaluar es la repetibilidad, para lo cual se realizaron ensayos por triplicado obteniéndose un DER de 4.89%, en el **figura 26** se muestran el registro para tres muestras.

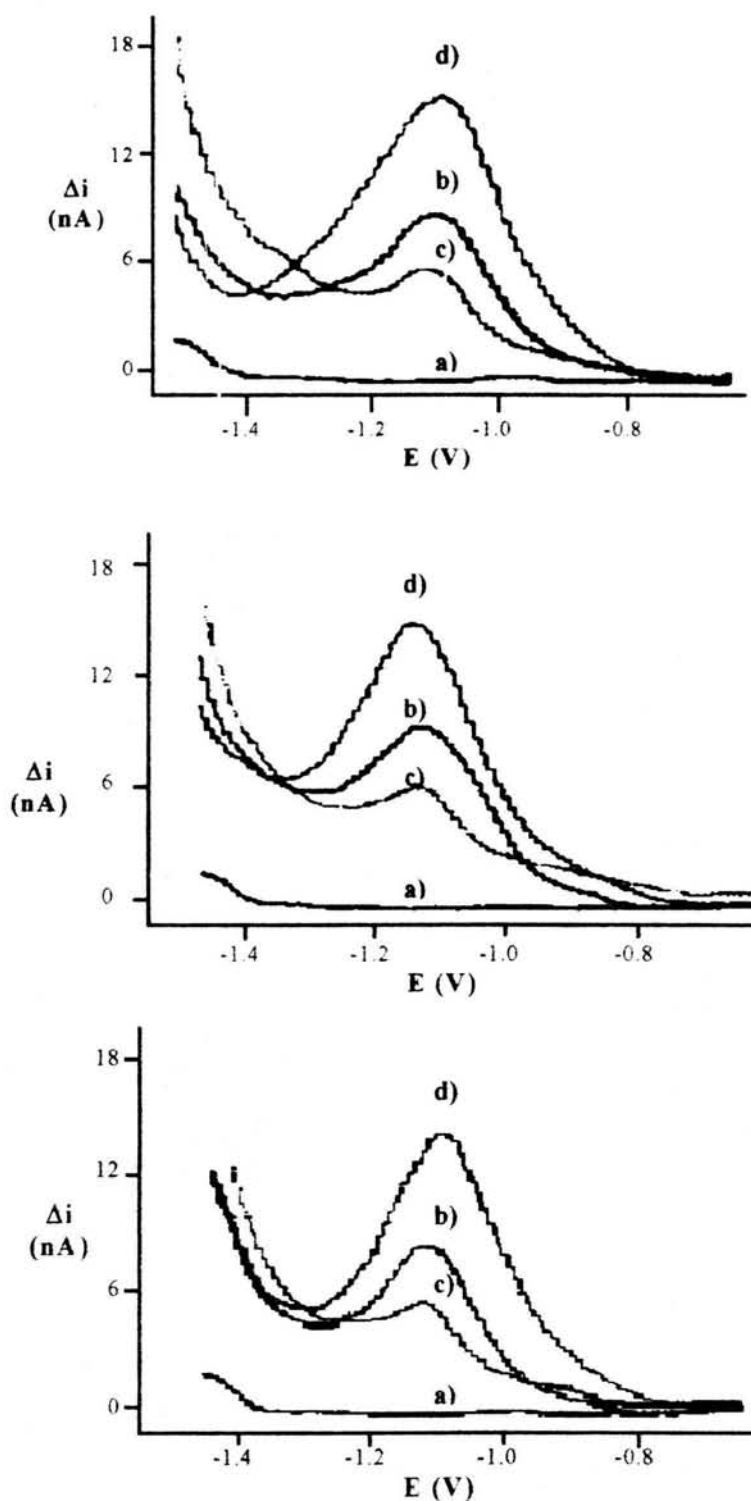
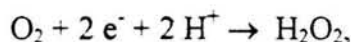


Figura 26 Polarogramas obtenidos por método directo al efectuar un barrido en sentido catódico del peróxido de hidrógeno en un medio de Tris 0.1 pH=8 y una matriz de plasma-acetona en tres muestras de animales control, a) dominio de electroactividad, b) matriz de plasma-acetona; c) adición de catalasa y d) adición de una solución estándar de  $H_2O_2$ .

### 5.1.2 Método indirecto

En este método se monitorea la señal de reducción del oxígeno:

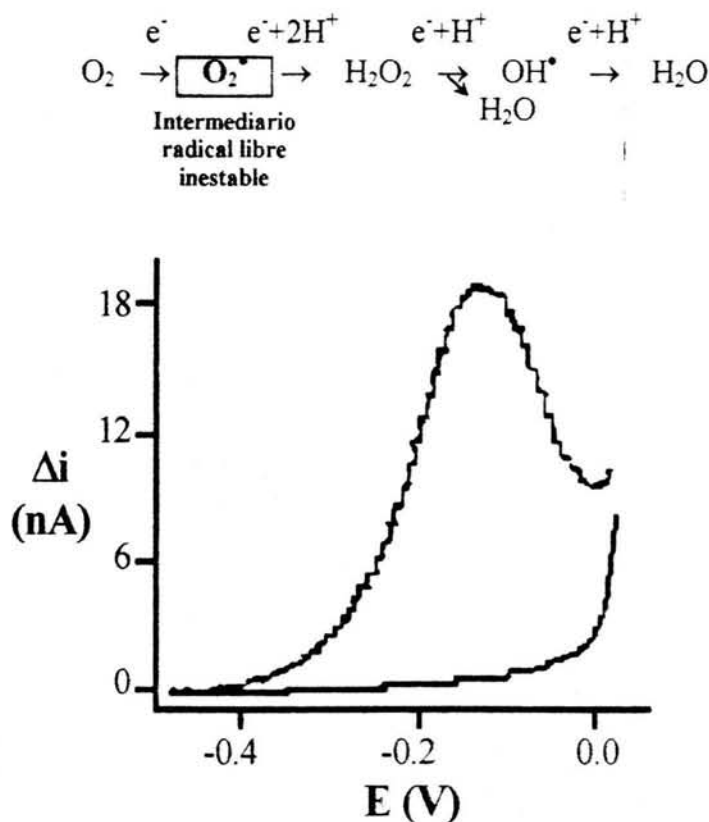


observándose un máximo en  $-0.13 \text{ V}$ , este analito es generado por la catalasa en la reacción enzimática redox:



y la señal que se obtiene se observa en la **figura 27**.

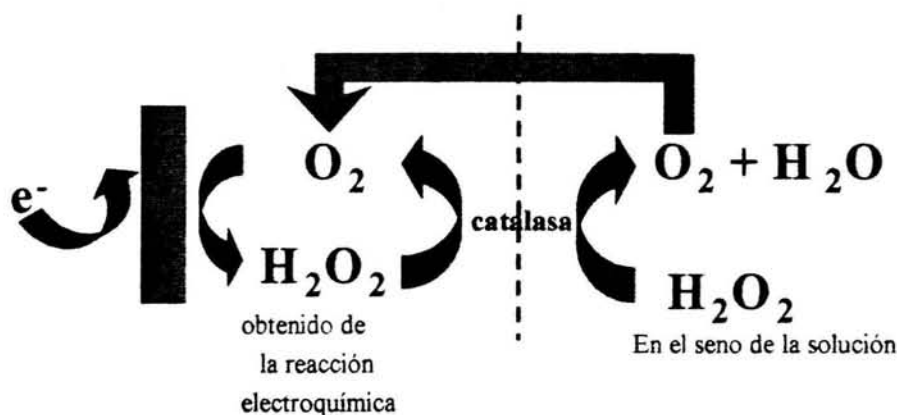
La reducción del oxígeno, igual que la del peróxido de hidrógeno, se lleva a cabo en dos etapas sucesivas con un intermediario radical libre altamente inestable, por lo cual se espera que la señal de reducción del  $\text{O}_2$  sea ancha; sin embargo ésta es más fina y de gran intensidad con respecto a la obtenida en el método directo.



**Figura 27** Señal generada por la reducción de  $\text{O}_2$  en polarografía diferencial de pulsos a  $10 \text{ mV/seg}$  en amortiguador de Tris  $0.1 \text{ M}$   $\text{pH}=8$ .



En la **figura 28** se aprecian los fenómenos al electrodo en este método, como se puede observar el peróxido de hidrógeno dismuta por la acción enzimática de la catalasa, generando oxígeno y agua, así el oxígeno producido difunde a la superficie del electrodo donde se lleva a cabo la reacción electroquímica que regenera el peróxido de hidrógeno, el cual dismuta nuevamente por la reacción enzimática de la catalasa que se encuentra en zona cercana a la superficie del electrodo; de tal suerte que se tiene un doble aporte del sustrato a la superficie del electrodo y por tanto un doble aporte de la especie que se reduce, razón por la cual la intensidad de corriente se incrementa.

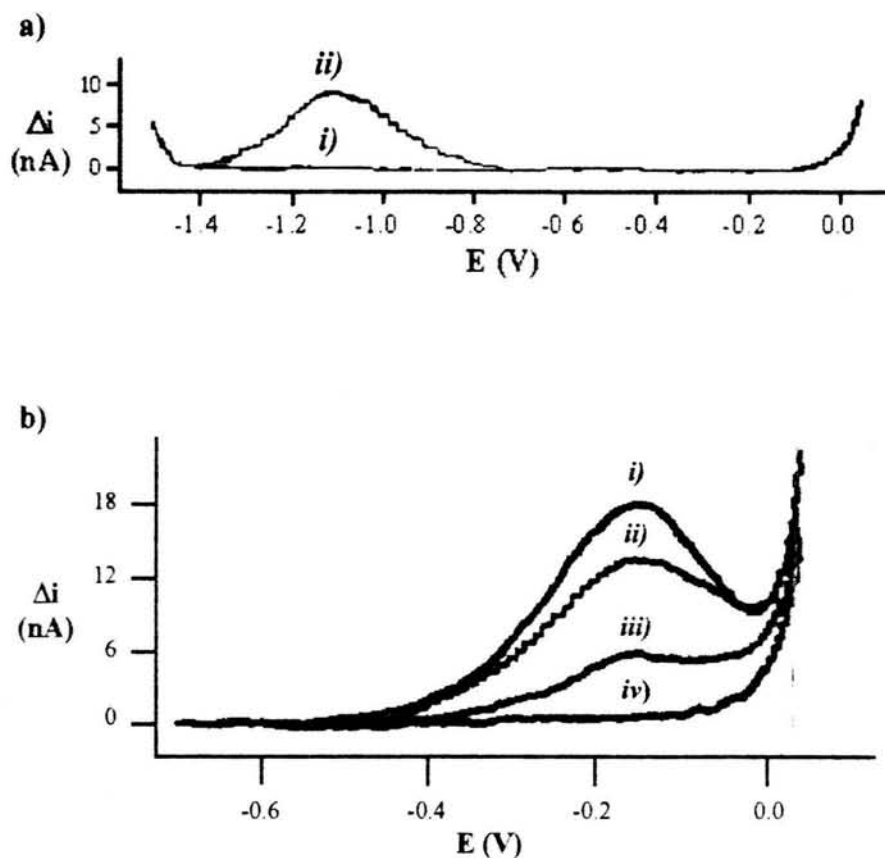


**Figura 28.** Fenómenos al electrodo en la determinación indirecta.

En este análisis se burbujea  $\text{N}_2$  en 2 mL del amortiguador (fosfatos o tris), posteriormente se adicionan 0.5 mL de la muestra y 50  $\mu\text{L}$  de la enzima, se dejan transcurrir 5 minutos para que todo el  $\text{H}_2\text{O}_2$  de la muestra reaccione, y finalmente se hacen las correspondientes adiciones de una solución estándar de  $\text{H}_2\text{O}_2$  debidamente valorada (**anexo 5**) para obtener las curvas de calibración.

El monitoreo se efectúa de la siguiente manera: se enciende el registrador, transcurridos 5 segundos se efectúa la adición con agitación por dos segundos y en el segundo 8 se empieza el barrido de potencial. Lo anterior debido a que el estudio acerca del tiempo de monitoreo muestra que la concentración del oxígeno al electrodo varía en función del tiempo (**figura 29**), lo anterior probablemente se deba a que el oxígeno difunda al seno de la solución, ya que como se sabe la solubilidad del  $\text{O}_2$  es de 1.3 mM en  $\text{H}_2\text{O}$  y la solubilidad del  $\text{O}_2$  en sangre es de 96.9  $\mu\text{M}$ , como se observa, el tiempo es inversamente proporcional a la intensidad de corriente, al tratar de

realizar este estudio, el menor tiempo requerido para hacer este análisis es de 8 segundos, cabe mencionar que este tiempo se podría abatir si se contara con un equipo automatizado.



**Figura 29** Estudio de la intensidad de corriente de la reducción de  $O_2$  en función del tiempo por polarografía diferencial de pulsos, en una matriz de plasma y Tris 0.1 M pH=8,  $v = 10\text{mV/seg}$ ;  
 a) *i* - dominio de electroactividad, *ii* - adición de una solución estándar de  $H_2O_2$ , y  
 b) señal de reducción de  $O_2$ , *i* - 10 segundos, *ii* - 20 seg, *iii* - 60seg y *iv* - 120 seg.

Nuevamente se evaluaron los mismos parámetros que en el caso anterior.

Con la finalidad de efectuar el estudio de la influencia del amortiguador en las curvas de calibración se utilizó un amortiguador de fosfatos 0.05 M pH=7 y tris 0.1M pH=8; por ser valores de pH cercanos al fisiológico, obteniéndose las curvas de calibración correspondientes. (figura 30)

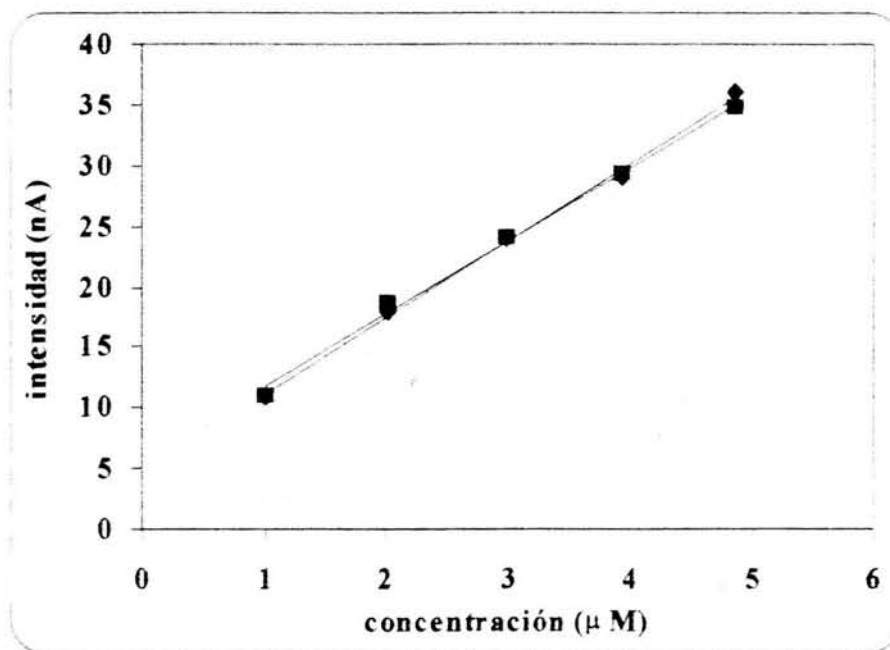


Figura 30 Efecto del amortiguador en la determinación del  $H_2O_2$   
 v amortiguador de fosfatos 0.05 M pH=7,  $\Delta i = 6.1 \pm 0.2 [H_2O_2] + 6.8 \pm 0.1$ ,  $r^2 = 0.9937$  y  
 ◄ amortiguador de Tris 0.1M pH=8,  $\Delta i = 6.1 \pm 0.2 [H_2O_2] + 6.5 \pm 0.2$ ,  $r^2 = 0.9962$ .

Como podemos observar las ecuaciones de las curvas de calibración obtenidas no son muy diferentes entre sí; ahora evaluaremos mediante una prueba estadística (tabla 12) si existe alguna ventaja entre utilizar amortiguador de fosfatos y Tris.

Tabla 12 Comparación de pendientes para evaluar el efecto del amortiguador.

Parámetro: amortiguador	Pendiente (nA/μM)	Desviación estándar	Valor de $t_{obtenido} = 0.669$ $\alpha = 0.05$	Valor de $t_{critico} = 2.31$ $\alpha = 0.05$
Amortiguador fosfatos 0.05M pH=8	6.1 <sub>4</sub>	0.2 <sub>1</sub>		
Amortiguador Tris 0.1M pH=8	6.0 <sub>6</sub>	0.1 <sub>7</sub>		

Se puede apreciar que el valor obtenido de  $F$  es menor al valor crítico por lo que se concluye que las curvas de calibración no difieren significativamente entre sí, lo cual se traduce en el hecho de que el amortiguador no tiene ningún efecto sobre la sensibilidad, esto se debe probablemente a la acción enzimática, ya que como sabemos, la actividad de una enzima depende del valor de pH, temperatura, concentraciones de enzima y sustrato. Sin embargo cuando se utiliza amortiguador de fosfatos, hay problemas en el registro, que se deben a que se presenta el fenómeno de adsorción de fosfatos a la superficie del electrodo, además de que las impurezas de los reactivos utilizados para la preparación del amortiguador de fosfatos estén interfiriendo con el estudio. (figura 31)

Por estas razones decidimos utilizar amortiguador de Tris 0.1M pH=8, en la determinación indirecta de peróxido de hidrógeno; además que implica un menor número de variables con respecto a la determinación directa.

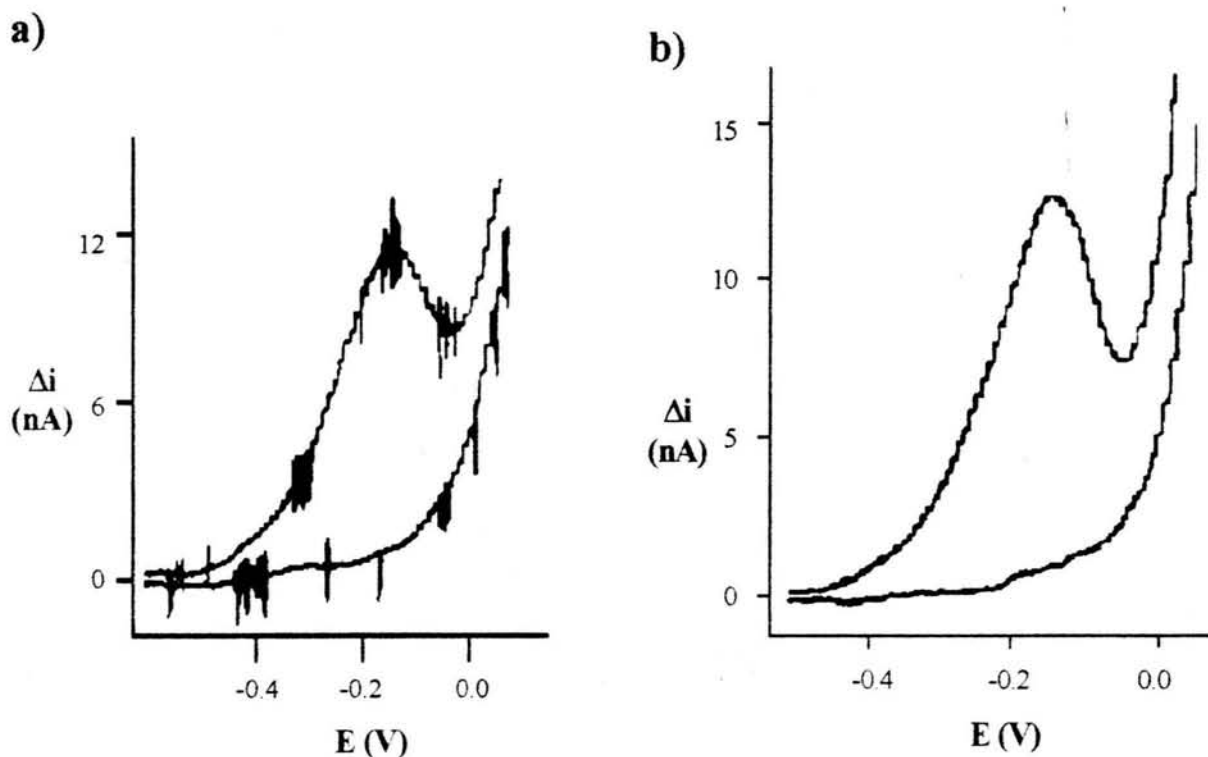


Figura 31 Señal de reducción de peróxido de hidrógeno y dominios de electroactividad en amortiguador de a) fosfatos 0.05 M pH=7 y b) Tris 0.1M pH=8 a 10 mV/seg.

Para evaluar el efecto de la matriz se ensayaron diferentes tipos: plasma, suero y plasma utilizando diferentes agentes precipitantes como metanol, acetona (que simbolizaremos como plasma-metanol y plasma-acetona respectivamente)

El resultado del estudio de los diferentes tipos de matrices en las curvas de calibración se presenta en la **figura 32**.

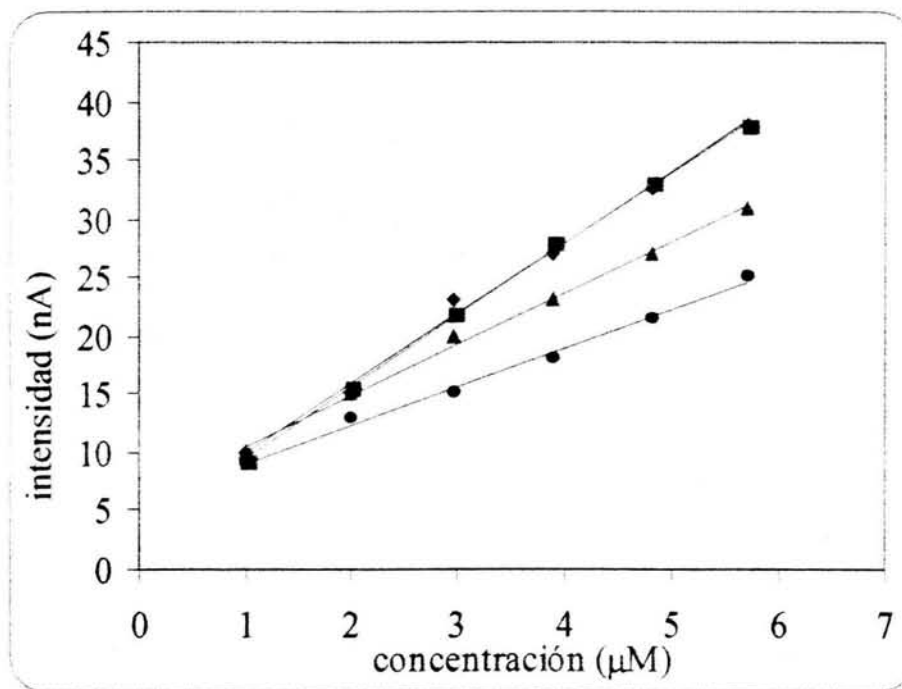


Figura 32 Efecto de la matriz sobre la determinación del  $H_2O_2$  utilizando el método indirecto en  
 ♦ amortiguador de Tris 0.1M pH=8, ■ plasma-metanol, ◆ plasma, ▲ plasma-acetona.

Las ecuaciones de las rectas obtenidas se presentan en la **tabla 13**.

Tabla 13 Ecuaciones de las rectas de calibración y sus coeficientes de correlación obtenidos en las matrices evaluadas.

TIPO DE MATRIZ	ECUACIÓN	$r^2$
Amortiguador de Tris 0.1 M pH=8	$\Delta i = 6.0 \pm 0.2 [H_2O_2] + 7.0 \pm 0.2$	0.9950
Tris 0.1 M pH=8 + plasma	$\Delta i = 6.1 \pm 0.1 [H_2O_2] + 7.1 \pm 0.2$	0.9936
Tris 0.1 M pH=8 + plasma-metanol	$\Delta i = 3.3 \pm 0.2 [H_2O_2] + 5.7 \pm 0.2$	0.9926
Tris 0.1 M pH=8 + plasma-acetona	$\Delta i = 4.4 \pm 0.2 [H_2O_2] + 6.1 \pm 0.1$	0.9958

En la **tabla 14** se aprecia el efecto de utilizar los tres diferentes tipos de matrices, se optó por ya no utilizar suero porque las muestras coagulaban lo cual dificultaba la toma de muestra.

Como ya se mencionó la señal de reducción de  $O_2$  obtenida en una matriz de plasma, es fina y dado que en este caso se registra la señal debida a la reducción del oxígeno, no se requiere de burbujear  $N_2$ , por esta razón se eligió trabajar con plasma, sin presentar problemas por la espuma además que se tiene la respuesta más sensible y semejante a la obtenida en amortiguador.

**Tabla 14** Evaluación del efecto de matriz por comparación de las pendientes de las curvas de calibración.

Parámetro: tipo de matriz	Pendiente (nA/ $\mu$ M)	Desviación estándar	Valor de $t_{\text{obtenido}}$ $\alpha = 0.05$	Valor de $t_{\text{critico}} = 2.31$ $\alpha = 0.05$
Amortiguador Tris 0.1M pH=8	5.9 <sub>6</sub>	0.1 <sub>6</sub>		
Plasma	6.1 <sub>2</sub>	0.1 <sub>2</sub>	1.568	
Plasma - metanol	4.1 <sub>7</sub>	0.1 <sub>7</sub>	15.028	
Plasma - acetona	3.29	0.1 <sub>8</sub>	21.730	

Como se puede apreciar las ecuaciones para amortiguador de Tris y plasma son muy parecidas entre sí. Se podría utilizar un método de adiciones estándar para efectuar la determinación utilizando una matriz de plasma – acetona y plasma –metanol, sin embargo con una matriz de plasma - metanol se presenta una señal no identificada (**figura 33**) adicional a la señal esperada, la cual se ubica muy cerca de la barrera anódica a diferencia empleando matrices de plasma y plasma – acetona, se tienen señales limpias y bien definidas pese a la cercanía de la barrera anódica. Pero, como se puede observar en el caso de plasma – acetona se tiene una sensibilidad menor que cuando se utiliza plasma o tris, por lo antes expuesto decidimos usar una matriz de plasma con lo cual se evita el tratamiento de la muestra que pudiera conllevar a su pérdida; para evitar que el burbujeo del  $N_2$  para desplazar el oxígeno pudiera ocasionar la pérdida de la muestra por adherencia de la solución a las paredes de la celda, la muestra se sonica durante 15 minutos y el análisis se realiza mediante adiciones estándar.

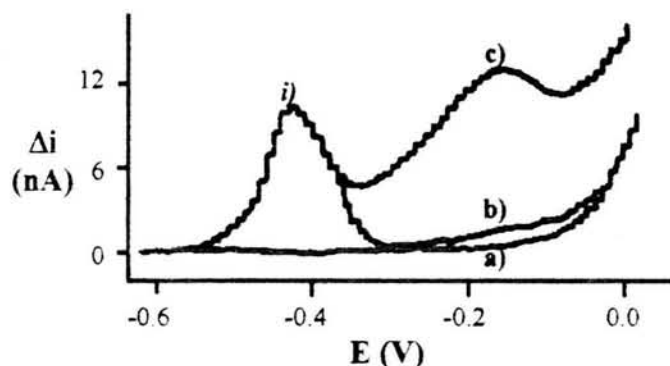


Figura 33 Señal de reducción de  $O_2$  obtenida en la determinación de peróxido de hidrógeno indirecta en una matriz de plasma-metanol en amortiguador de Tris 0.1M pH=8,  $v = 10$  mV/seg, a) dominio de electroactividad, b) adición de catalasa y c) adición de la matriz de plasma - metanol, i) señal no identificada.

Nuevamente haremos uso de la definición de trazabilidad, como una forma para evaluar la veracidad y precisión debido a que no contamos con una referencia de nivel metrológico; para lo cual se procedió a evaluar el porcentaje de analito recuperado de la misma manera que en el método directo.

En este caso, la alternativa más confiable para la determinación de peróxido de hidrógeno es la que se realiza en una matriz de plasma, en la **figura 34** se muestra la evaluación de la fracción de recobro para cada uno de los casos.

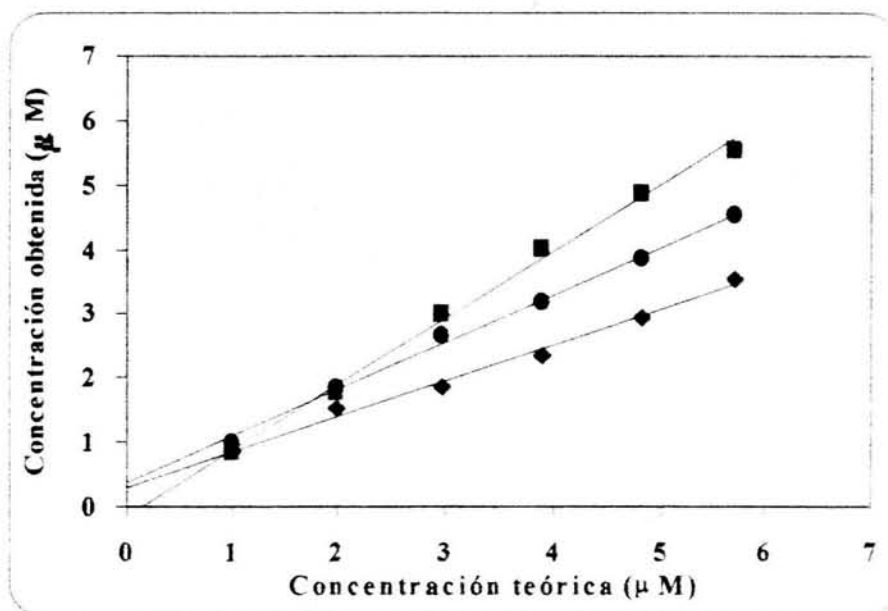


Figura 34 Fracción recuperada en Tris 0.1M pH=8,  $v = 10$  mV/seg,  
 ◆ plasma-metanol,  $\Delta i = 0.55 \pm 0.02 [H_2O_2] - 0.30 \pm 0.09$ ,  $r^2 = 0.9926$ ;  
 ● plasma,  $\Delta i = 0.73 \pm 0.02 [H_2O_2] - 0.36 \pm 0.09$ ,  $r^2 = 0.9958$  y  
 ◆ plasma-acetona,  $\Delta i = 1.03 \pm 0.04 [H_2O_2] - 0.14 \pm 0.16$ ,  $r^2 = 0.9956$ .

Mediante una prueba estadística se compararon los valores de la pendiente con la unidad, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 15.

**Tabla 15** Evaluación del porcentaje de recobro por comparación de los valores de la pendiente de las curvas de calibración con la unidad.

tipo de matriz	Pendiente (nA/ $\mu$ M)	Desviación estándar	Valor de $t_{\text{obtenido}}$ $\alpha = 0.05$	Valor de $t_{\text{critico}} = 2.78$ $\alpha = 0.05$
plasma	1.026 <sub>2</sub>	0.007 <sub>4</sub>	0.6215	
plasma-acetona	0.733 <sub>1</sub>	0.006 <sub>6</sub>	7.4232	
plasma-metanol	0.551 <sub>5</sub>	0.009 <sub>7</sub>	10.2770	

Como se puede apreciar en los casos donde se usa un agente precipitante de proteínas el valor de  $t$  supera al valor crítico, por lo que se concluye que el valor de la pendiente difiere significativamente de la unidad y los porcentajes de recobro en estos casos son del 73.3 y 55.2% respectivamente.

Ahora se va a demostrar mediante una prueba estadística si el valor de la ordenada al origen difiere significativamente de cero.

**Tabla 16** Evaluación del porcentaje de recobro por comparación de los valores de la ordenada al origen de las curvas de calibración con cero.

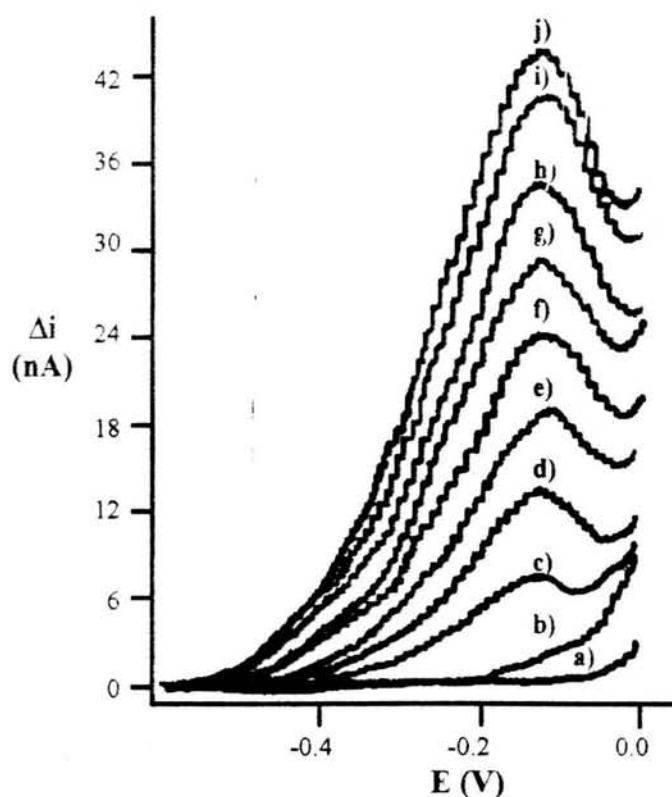
tipo de matriz	ordenada al origen (nA)	Desviación estándar	Valor de $t_{\text{obtenido}}$ $\alpha = 0.05$	Valor de $t_{\text{critico}} = 2.78$ $\alpha = 0.05$
plasma	0.14 <sub>5</sub>	0,06 <sub>0</sub>	1,3208	
plasma-acetona	0.36 <sub>7</sub>	0,03 <sub>5</sub>	4.3439	
plasma-metanol	0.29 <sub>7</sub>	0.03 <sub>4</sub>	3.5574	

Como se puede apreciar solamente en el caso de plasma se tiene un valor de ordenada al origen que no difiere significativamente de cero, en tanto que cuando se utiliza una matriz que contiene un agente precipitante se tiene un valor que si difiere significativamente con respecto a cero, esta conclusión se obtiene a partir de la comparación de los valores de  $t_{\text{critico}}$  y de  $t_{\text{obtenido}}$  (tabla 16).



Esto respalda nuestra decisión acerca de usar una matriz de plasma para llevar a cabo la determinación de este analito cuando se sigue la señal de reducción del  $O_2$ , es decir, empleando el método indirecto.

El registro típico obtenido de una curva de calibración típica obtenida por este método se muestra en la **figura 35**, donde se observa que el valor del potencial al que se tiene la mayor diferencia entre los valores de  $\Delta i$  es en  $-0.12$  V.



**Figura 35** Polarogramas típicos de una curva de calibración obtenida por método directo en un Tris 0.1 M pH=8, en una matriz de plasma con adiciones de una solución 0.1 mM de  $H_2O_2$ :

- a) dominio de electroactividad, b) Tris 0.1 M pH=8 + catalasa y adiciones de c) 25  $\mu$ L, e) 50  $\mu$ L, f) 75  $\mu$ L, g) 100  $\mu$ L, h) 125  $\mu$ L, i) 150  $\mu$ L y j) 175  $\mu$ L.

En la **figura 36** se muestra la respuesta lineal de la curva de calibración obtenida por esta metodología.

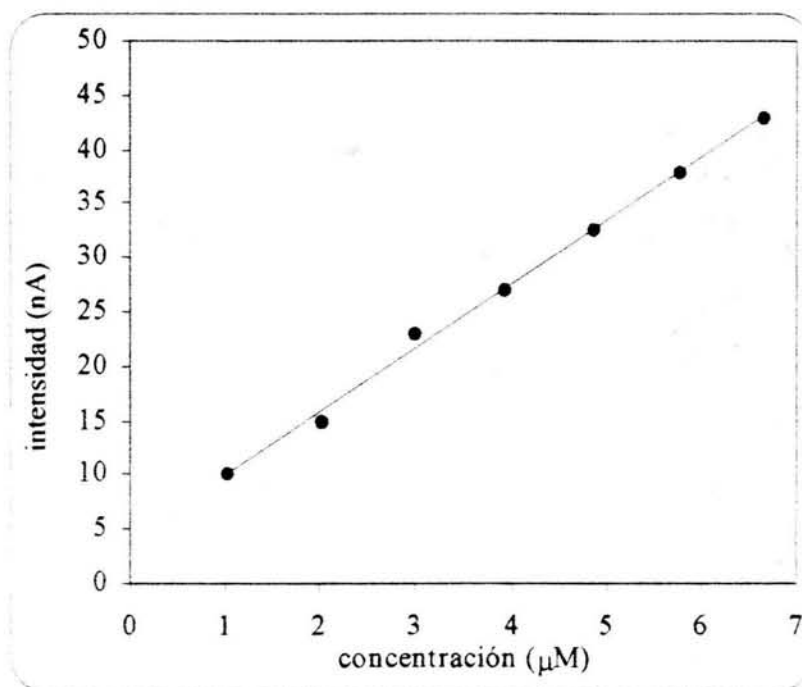


Figura 36 Curva de calibración de  $H_2O_2$  en Tris 0.1 M pH=8 utilizando una matriz de plasma obtenida por método indirecto,  $\Delta i = 6.0 \pm 0.01 [H_2O_2] - 2.4 \pm 0.2$ ,  $r^2 = 0.9919$ .

Ahora analizaremos si los datos se distribuyen con una secuencia aleatoria o presentan una tendencia para lo cual utilizaremos la prueba de Wald-Wolfowitz [37]; con lo que podremos establecer el intervalo lineal de trabajo, utilizando un análisis de residuos.

En el **anexo 8** se ilustra el análisis de residuos para 8, 7 y 6 observaciones, el número de rachas y la tendencia de los residuos (+ o -), con la información anterior conoceremos si estos resultados pueden representarse utilizando nuevamente un modelo lineal.

El resumen de los parámetros obtenidos (número de rachas y número de residuos con signo positivo o negativo) se muestra en la **tabla 17**.

Tabla 17 Resumen de los parámetros en la prueba de Wald-Wolfowitz.

número de observaciones	N	M	número de rachas observado	número de rachas teórico
8	3	5	3	<3
7	4	3	6	3-8
6	3	3	5	<3

Como se puede observar, para 8 observaciones, el número de rachas debe ser mayor que 3 por lo cual se concluye que se presenta una tendencia, en tanto que para 7 y 6 observaciones el número de rachas se encuentra dentro del valor teórico, lo cual indica que estos resultados, debido a la aleatoriedad, se pueden representar mediante un modelo lineal.

En el **anexo 9** se muestra la suma de los cuadrados de los residuos para 8, 7 y 6 observaciones que nos permitirá determinar el intervalo lineal de trabajo.

Como se aprecia, la suma del cuadrado de los residuos para 8 observaciones difiere del valor de la suma obtenido para 7 y 6 observaciones, en tanto que estos dos últimos no difieren de manera apreciable entre sí.

Para corroborar lo anterior se aplicó una prueba estadística, la cual permitirá establecer el límite superior del intervalo lineal de concentración en el método directo.

**Tabla 18** Evaluación del intervalo lineal de las curvas de calibración para 8, 7 y 6 observaciones.

n	7	6	5
promedio	0,1906	0,0203	-0,0066
desviación estándar	11,6030	0,4108	0,4562
t obtenido	1,1843	0,5420	-0,0119
t crítico	2,36	2,45	2,57

Como se aprecia, en ningún caso, el último residuo difiere significativamente del promedio de los anteriores, sin embargo se observó anteriormente que para 8 observaciones hay una tendencia logarítmica, por lo cual al evaluar ambas pruebas estadísticas se concluye que el límite superior del intervalo lineal es 6.65  $\mu\text{M}$ .

Para encontrar la concentración inferior para la cual esta metodología es válida emplearemos nuevamente la definición de:

$$y = y_B + 3\sigma_B, [37]$$

donde encontramos una concentración de 0.0313  $\mu\text{M}$  como límite de detección.

Utilizando la definición:

$$y = y_B + 10\sigma_B, [37]$$

se obtiene un límite de cuantificación de 0.1044  $\mu\text{M}$ .

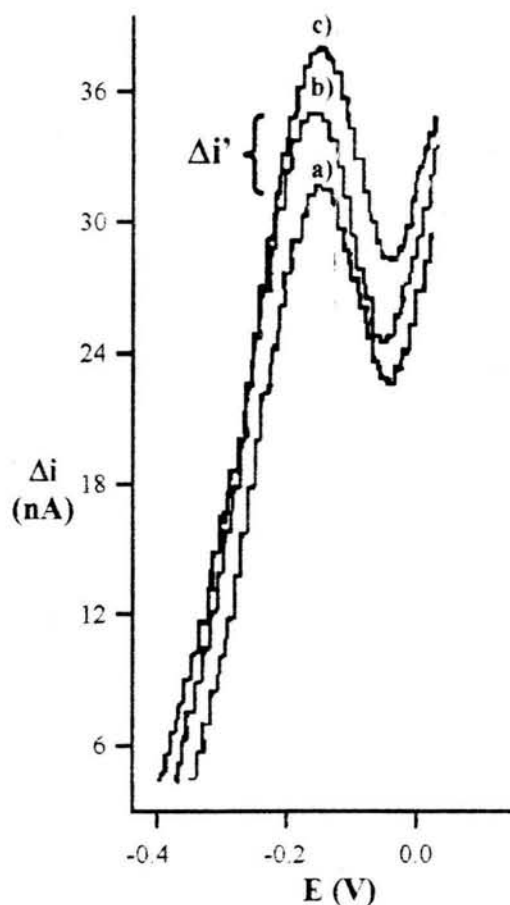
Y finalmente aplicando:

$$y = y_B + 1.5\sigma_B, [37]$$

se llega a un valor de  $0.0157 \mu\text{M}$  como límite de decisión.

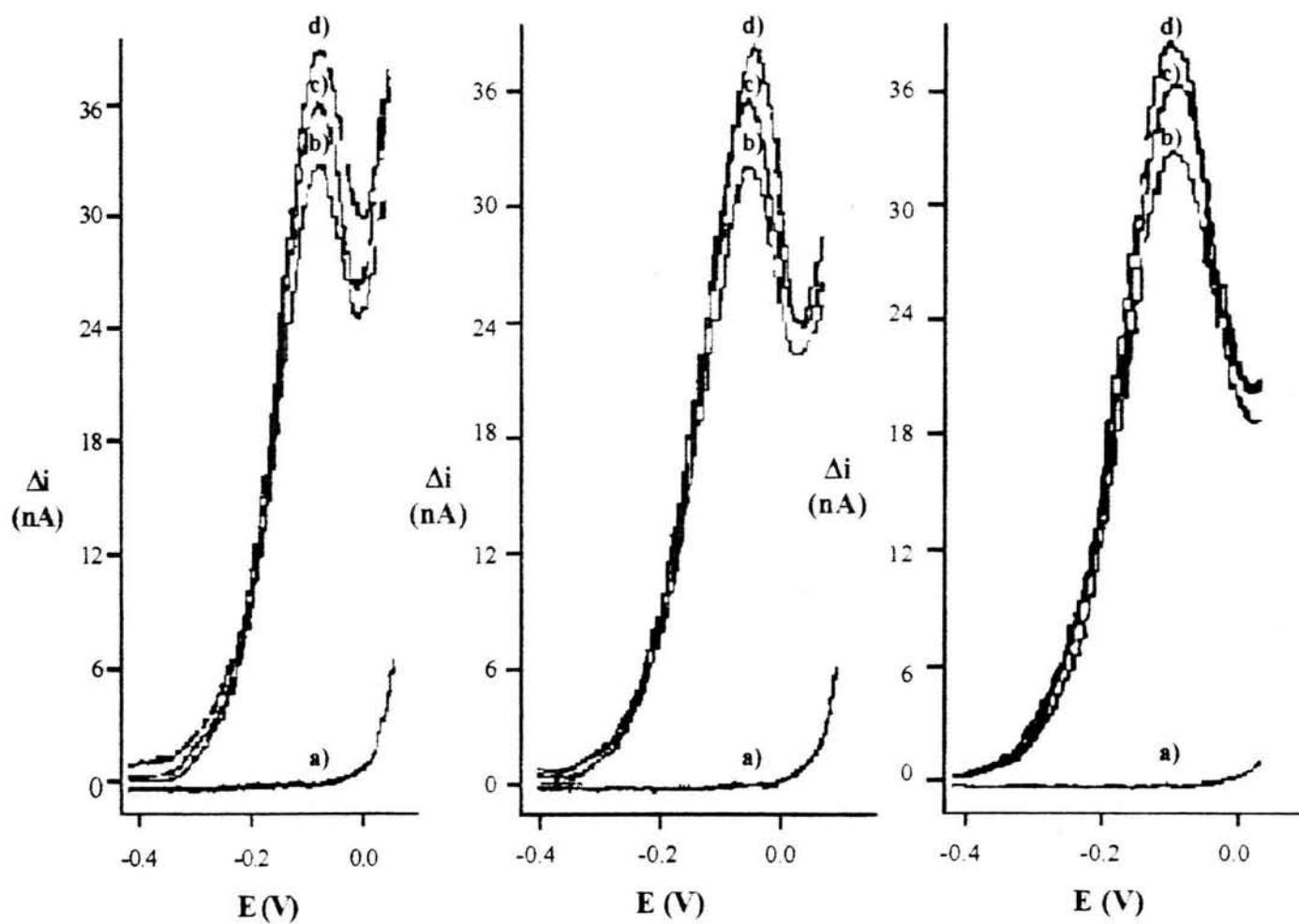
Lo anterior nos permite establecer el intervalo de linealidad que va desde  $0.10$  a  $6.65 \mu\text{M}$ , siendo éste menor que el obtenido por método directo probablemente por la saturación de la enzima.

La selectividad del método se muestra en la **figura 37** donde se aprecia que a la muestra **(a)** se le efectúa una adición de catalasa, lo que se traduce en un incremento en la señal de reducción de oxígeno debido a la conversión del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  **(b)** y una posterior adición de una solución estándar de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que nuevamente provoca un incremento en la señal de reducción de  $\text{O}_2$  generado en la reacción catalizada por la enzima **(c)**.



**Figura 37** Respuesta de la determinación indirecta de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de una muestra plasma de un control, en amortiguador de Tris  $0.1\text{M}$   $\text{pH}=8$ , cuya concentración fue de  $15.5 \pm 0.84 \mu\text{M}$  obtenida por interpolación en una curva de calibración; a) muestra, b) muestra + enzima y c) muestra + enzima + adición estándar donde  $\Delta i'$  se atribuye a la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la muestra..

La repetibilidad se evaluó realizando ensayos por triplicado donde se obtuvo un DER de 5.43%, en el **figura 38** se muestra el registro para tres muestras.



**Figura 38** Polarogramas obtenidos por método indirecto al efectuar un barrido en sentido catódico del oxígeno en un medio de Tris 0.1 pH=8 y una matriz de plasma en tres muestras de animales control, a) dominio de electroactividad, b) matriz de plasma, c) adición de catalasa y d) adición de una solución estándar de  $H_2O_2$ .

## 5.2 Comparación de ambas metodologías.

Para realizar la comparación de ambos métodos se establecerá la igualdad de 3 parámetros analíticos bajo los siguientes criterios:

- a) **Repetibilidad:** “En el intervalo de confianza para la razón de varianzas (calculada a partir del porcentaje recuperado de exactitud al 100%, del porcentaje recuperado de linealidad del método y de la varianza del método del estudio de precisión) debe localizarse el valor de 1”.
- b) **Exactitud al 100%:** “En el intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas del porcentaje recuperado, debe localizarse el valor cero”.
- c) **Linealidad del método:** deben evaluarse 3 criterios.
  - i) “En el intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas del porcentaje recuperado, debe localizarse el valor cero.
  - ii) En el intervalo de confianza para la diferencia de la pendiente de cantidad adicionada – cantidad recuperada debe localizarse el valor de cero.
  - iii) En el intervalo de confianza para la diferencia de las ordenadas al origen de cantidad adicionada – cantidad recuperada debe localizarse el valor de cero”.<sup>52</sup>

La información requerida para llevar a cabo este estudio se presenta a continuación:

$\sigma_1$	Desviación estándar del porcentaje recuperado utilizando método directo.
$\sigma_2$	Desviación estándar del porcentaje recuperado utilizando método indirecto.
$N_1$	Número de porcentajes recuperados utilizando método directo.
$N_2$	Número de porcentajes recuperados utilizando método indirecto.
$R_1$	Media aritmética del porcentaje recuperado en el método directo.
$R_2$	Media aritmética del porcentaje recuperado en el método indirecto.
LSIC	Límite superior del intervalo de confianza.
LIIC	Límite inferior del intervalo de confianza.
$\Sigma x, \Sigma x^2,$ $\Sigma y, \Sigma y^2$ y $\Sigma xy$	Suma de los parámetros correspondientes para el trazo de la curva cantidad adicionada–cantidad recuperada de cada uno de los métodos.
$\sigma_E^2$	Varianza de error de regresión.
$\sigma_{dm}^2$	Varianza de la diferencia de pendiente.
$\sigma_{do}^2$	Varianza de la diferencia de ordenadas.

**a) Repetibilidad**

Los resultados del intervalo de confianza son:

$$\text{LSIC} = 1.3085$$

$$\text{LIIC} = 0.2539$$

Los métodos si tienen la misma repetibilidad ya que en el intervalo de confianza se localiza el valor de 1.

**b) Exactitud al 100% y linealidad del método.**

Dado que ambos métodos presentan la misma repetibilidad, se debe calcular una desviación estándar promedio que es de:

$$\sigma_p = 19.5479$$

con lo cual se obtienen los siguientes límites del intervalo de confianza:

$$\text{LSIC} = 3.4439$$

$$\text{LIIC} = -1.2842$$

Los métodos tienen una linealidad equivalente, en términos de porcentaje recuperado, ya que en el intervalo de confianza se localiza el valor de cero.

**c) Linealidad del método (pendientes y ordenadas al origen de la cantidad adicionada – cantidad recuperada).**

Para evaluar este parámetro se debe calcular la varianza de error de regresión, en este caso da un valor de:

$$\sigma_E^2 = 0.0553$$

Ahora establecemos el valor de la desviación estándar de la diferencia de pendiente

$$\sigma_{dm} = 0.0679$$

lo que nos permite establecer el intervalo de confianza para los valores de las pendientes

$$\text{LSIC} = 5.5147$$

$$\text{LIIC} = -5.5669$$

y finalmente se evalúa el intervalo de confianza de los valores de ordenada al origen por ambos métodos, para lo cual calculamos el valor de la desviación estándar de la diferencia de ordenadas cuyo valor es de:

$$\sigma_{do} = 0.2310$$

y el intervalo de confianza de:

$$LSIC = 0.5252$$

$$LIIC = -0.2652$$

Ya que en el intervalo de confianza para la diferencia de las pendientes y para la diferencia de ordenadas al origen, se localiza el valor de cero, se concluye que los parámetros analíticos de las metodologías propuestas son equivalentes.

**NOTA: Las fórmulas para este análisis se encuentran en el anexo 11.**

Además de que los métodos propuestos en este trabajo no difieren entre sí significativamente, hay que mencionar las ventajas de emplear estas metodologías, ambos estudios se realizan en presencia de un elemento selectivo como la catalasa, además de que el tiempo requerido para un análisis requiere menos de 20 minutos, y este tiempo es mayoritariamente de burbujeo de  $N_2$  para desplazar el oxígeno del amortiguador, es suficientemente sensible para distinguir diferentes niveles de  $H_2O_2$  en sangre, son precisos ya que los valores de DER están entre 4-6%, el tratamiento de la muestras es el menor posible para evitar la pérdida de la muestra, los costos del análisis son pequeños en comparación con otras técnicas.

Hay que remarcar el hecho de que los métodos propuestos compiten frente a otras metodologías con numerosas ventajas como son:

- Los métodos propuestos utilizan la oxidación de un sustrato por un reactivo en ocasiones se emplean peroxidasas; participando en dicha reacción el analito de interés, e incluso el diseño de sensores a base de una molécula mediadora, como polímeros o complejos inorgánicos, es decir **la determinación no se lleva a cabo de manera directa.**
- En las metodologías propuestas se debe cumplir con dos parámetros, evaluación de la selectividad con el uso de catalasa y para garantizar que el incremento en la propiedad medida se deba al incremento en la concentración de este analito, la adición posterior de  $H_2O_2$ , ambos **parámetros no se evalúan en los métodos reportados.**
- El tratamiento de la muestra es drástico por ejemplo para HPLC la muestra es tratada con hexano, ácido tricloroacético, se filtra y finalmente se diluye en metanol; se emplean numerosos reactivos que en ocasiones tienen que ser sintetizados como



---

ejemplo podemos citar una metodología que utiliza la técnica de espectrofotometría, para lo cual tiene que sintetizar 4-amino-5-(p-aminofenil)-1-metil-2-fenilpirazol-3-ona, además del empleo de la sal sódica de N-etil-N-sulfopropilánilina. La síntesis emplea tiempo y reactivos, por lo que, tanto los costos como el tiempo invertido se incrementan, en contraste con las metodologías que se proponen en este trabajo. Además a la muestra no se le realiza un tratamiento drástico, que pudiera conllevar a la degradación del analito, aunado a esto, el tiempo y los costos de análisis se abaten por la cantidad y disponibilidad de los reactivos empleados y la cantidad de desechos, por lo que resultan ser metodologías baratas.

- Las matrices utilizadas en los métodos reportados son generalmente más simples (agua de alberca sintética, medicinas, agua de nieve) que las muestras biológicas (sangre, tejidos, orina), que dada su complejidad puede presentar interferencias.

Pese a numerosas ventajas que presentan frente a otros métodos hay que mencionar las desventajas que presentan, por ejemplo:

- El método directo proporciona una sensibilidad menor con respecto al método indirecto.
- En el método indirecto la medición está en función del tiempo, por lo que se tiene una variación superior que en el método directo.
- El intervalo lineal es menor en el método indirecto.
- El tipo de matriz empleada en cada método es diferente (plasma-acetona y plasma).

### 5.3 Aplicación del método - determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en muestras clínicas control y tratadas.

Una vez establecidos los parámetros de la determinación, se llevó a cabo el análisis de muestras, que se sabe proporcionan una diferente concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como respuesta a la administración de los diferentes fármacos.

Para garantizar la aleatoriedad de la muestra, en cada sesión se analizaron un promedio de 9 muestras con diferente tratamiento (generalmente 3 muestras control, 3 con metil-amina y 3 con hidralazina, en este análisis no se consideraron las muestras que presentaban hemólisis). El tratamiento de las muestras se describe en el **anexo 4**.

Utilizando el método directo al realizar este análisis, en muestras de animales control se obtiene una concentración de:

$$15.25 \pm 0.85 \mu\text{M con } n = 20$$

y por método indirecto se tiene

$$15.32 \pm 0.75 \mu\text{M con } n = 20.$$

El análisis de muestras tratadas se realizó por ambas metodologías corroborando el comportamiento fisiológico reportado en la literatura, en el cual, para animales estimulados en la producción de peróxido de hidrógeno mediante la administración de metilamina se obtuvo un valor de:  $23.17 \pm 1.35 \mu\text{M}$  y para animales inhibidos al suministrarles hidralazina se encontró:  $11.28 \pm 0.47 \mu\text{M}$  utilizando el método directo y por el método indirecto se tuvieron concentraciones de  $24.08 \pm 0.97$  y  $10.73 \pm 0.49 \mu\text{M}$  respectivamente con  $n = 20$ .

La comparación de la concentración encontrada para cada una de estas situaciones (muestras de plasma de animales tratados, estimulados e inhibidos en su producción de peróxido de hidrógeno, y el control) se aprecia en la **figura 39**:

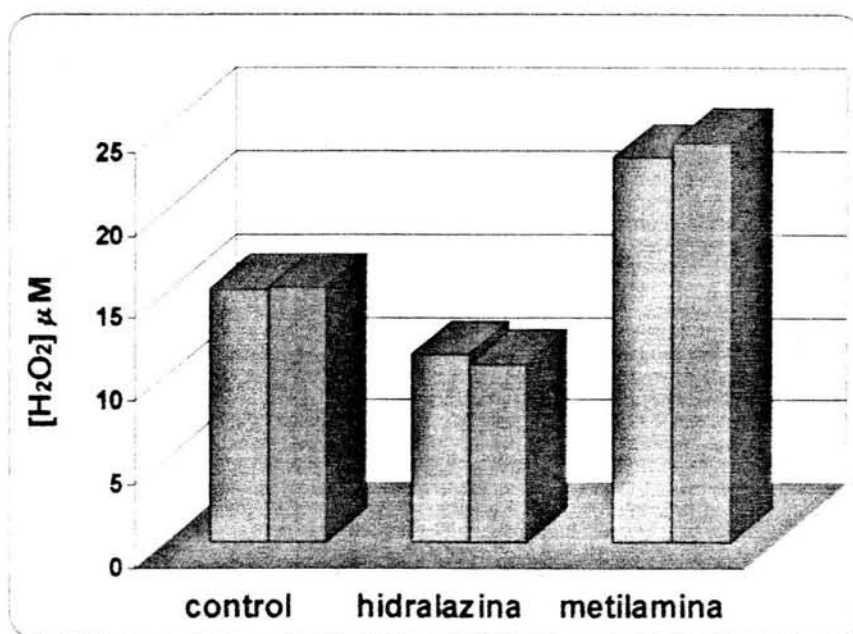


Figura 39 Comparación de las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en amortiguador de Tris 0.1M pH=8, determinación directa ● en una matriz de plasma – acetona, e indirecta ● en una matriz de plasma por polarografía diferencial de pulsos a 10 mV/seg.

Para evaluar la variación de las 3 fuentes diferentes, entre tratamientos, metodologías y el error experimental se utilizará una prueba de Análisis de Varianza (ANOVA).

Esta prueba nos permitirá separar y estimar si los diferentes tratamientos tienen una diferencia significativa en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y si la diferencia entre ambos métodos es más grande que la debida al error aleatorio y de esta manera poder estimar su varianza.

En este caso utilizamos un análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo; los resultados de aplicar a nuestras determinaciones se muestran en la **tabla 19** en donde n=20.

**Tabla 19** Análisis de varianza de dos factores con varias muestra por grupo.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Valor de $F_{obtenido}$	Valor de $F_{critico}$
Método	0,6458	1	0,6458	0,3666	3,9243
Tratamiento	3295,9502	2	1647,9751	935,6412	3,0758
Interacción	10,6614	2	5,3307	3,0265	3,0758
Dentro de los grupos	200,7919	114	1,7613		
Total	3508,0492	119			

Este análisis, proporciona un valor de  $F$  de 0.3666, dado que el valor crítico de  $F$  es de 3.9243, podemos inferir que los resultados proporcionados por ambas técnicas no difieren significativamente, por lo que pueden usarse indistintamente, sin embargo hay que remarcar que el método directo es más sencillo de llevar a cabo, debido a que los registros no deben hacerse a intervalos de tiempo definidos como los del método indirecto.

Además al evaluar si las variaciones existentes cuando se aplica el mismo método se deben al tratamiento de la muestra, en este análisis se encuentra que el valor obtenido de  $F$  es mucho mayor (935.6) que el valor de  $F_{\text{crítico}}$  (3.0758), por lo que concluimos que ambos métodos nos permiten discernir entre las diferentes respuestas al administrar un fármaco que modifica, ya sea que estimule o inhiba la producción de  $H_2O_2$ .

Cabe señalar que entre tratamientos se esperaba una diferencia significativa, porque de acuerdo a la literatura, las respuestas varían de acuerdo al fármaco aplicado.

La interacción no es significativa ya que el valor de  $F$  obtenido es menor al crítico.

En una prueba final se corroboró el efecto que causa la administración de ambos fármacos (metilamina-hidralazina), utilizando únicamente el valor medio de cada tratamiento con diferentes fármaco, debido a que de este último sólo se tuvieron 6 muestras.

Los resultados al aplicar un ANOVA de dos factores con una sola muestra por grupo se muestran en la **tabla 20**.

**Tabla 20** Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Valor de <math>F_{\text{obtenido}}</math></i>	<i>Valor de <math>F_{\text{crítico}}</math></i>
Entre métodos	0,1343	1	0,1343	0,2676	10,1280
Entre tratamientos	165,4152	3	55,1384	109,8707	9,2766
Error	1,5055	3	0,5018		
Total	167,0551	7			

Como se aprecia en esta tabla, la variación entre métodos no es significativa en tanto que la variación entre tratamientos sí lo es.

Ahora estimaremos la variación, sabemos que si no hubiera diferencia entre los tratamientos y los métodos, entonces la suma de los cuadrados medios proporciona una estimación de la varianza atribuida a la variación aleatoria del error experimental.

---

En este caso tenemos una variación debida al tratamiento, por lo cual podemos estimar la varianza debida a esta situación ( $\sigma_{\text{tratamientos}}^2$ ); se sabe que el cuadrado medio entre los tratamientos proporciona una estimación de  $\sigma_0^2 + c\sigma_{\text{tratamientos}}^2$ , donde la varianza en la medición ( $\sigma_0^2$ ) es una estimación de los errores aleatorios en la medida,  $c$  es el número de tratamientos y por tanto el valor de la varianza será de:

$$\sigma_{\text{tratamientos}}^2 = (\text{cuadrado medio entre tratamientos} - \sigma_0^2) / 4$$

$$\sigma_{\text{tratamientos}}^2 = (55.1384 - 0.5018) / 4$$

$$\sigma_{\text{tratamientos}}^2 = 13.6592$$

donde esta variación se debe al tratamiento al que fue sometido cada animal de la muestra.

Sin embargo no hay que olvidar que la máxima imprecisión se sitúa en la escala de señal ( $\Delta i$ ), ya que estos datos requieren de un mayor esfuerzo y costo experimental, mientras que los datos de concentración dependen de operaciones de pesar y medir volumen, que permiten asegurar un mayor número de cifras significativas. (**Anexo2**)

## 6. PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> EN MUESTRAS CLÍNICAS.

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indica la participación de especies tóxicas oxidantes en el daño de los tejidos asociadas a la acción biológica de algunos fármacos, así como a ciertas condiciones fisiológicas, como el ejercicio, o patológicas, como es el caso de la hipertensión arterial.

Dada la importancia de la cuantificación de este compuesto el siguiente texto proporciona dos metodologías para llevar a cabo la cuantificación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a nivel μM, en muestras de plasmas utilizando la técnica de polarografía diferencial de pulsos..

En esta técnica el peróxido de hidrógeno proporciona una señal debida a la reducción a -0.92 V vs ECS, además al reaccionar con la catalasa genera oxígeno, el cual presenta una señal de reducción a -0.20 V vs ECS; este monitoreo se puede utilizar para la determinación de peróxido de hidrógeno y se han propuesto dos alternativas: método directo e indirecto.

### PROCEDIMIENTO

#### I. MÉTODO DIRECTO

##### a) Curva de calibración.

1. Preparar una solución 100 μM a partir de una solución estándar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> previamente valorada con KMnO<sub>4</sub> normalizado. La determinación volumétrica de peróxido de hidrógeno se describe en el **anexo 5**.
2. Encender el equipo y en una celda se colocan 2 mL de una solución amortiguadora de Tris 0.1 M pH = 8, a la cual se le burbujea N<sub>2</sub> por 10 minutos, al término de este tiempo se realiza el polarograma correspondiente en las siguientes condiciones:

$$E_m = -0.65 V$$

$$E_f = -1.4 V$$

$$v_b = 10 mV/s$$

$$\Delta E = 50 mV$$

$$tiempo\ de\ goteo = 1\ gota/seg$$

$$Sensibilidad\ de\ la\ intensidad\ de\ corriente: 1nA.$$

3. Hacer adiciones de 25 μL de la solución estándar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y monitorear la respuesta correspondiente a cada adición.

**NOTA:** Burbujear N<sub>2</sub> por un tiempo de 2 minutos después de cada adición.

4. Trazar la curva de calibración.

**b) Tratamiento y determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la muestra.**

1. Obtener aproximadamente 1 mL de una muestra de sangre, la cual debe recibirse en un tubo con 0.1 mL de heparina 10 U.
2. Adicionar 1.5 mL de acetona y centrifugar a 6000 r.p.m. durante 30 minutos.
3. Colocar en una celda 2 mL de la solución amortiguadora de Tris 0.1 M pH = 8 y burbujear N<sub>2</sub> por 10 minutos, al término de este tiempo se realiza el polarograma correspondiente al dominio de electroactividad, en las condiciones antes mencionadas.
4. Tomar una alícuota de 500 µL y verterla en el medio, burbujear N<sub>2</sub> por 2 minutos, al finalizar este tiempo se traza el polarograma.

NOTA: Las muestras no deberán presentar hemólisis.

5. Posteriormente se realiza la adición de 50 µL de catalasa 1000 U, se agita y se deja transcurrir un tiempo de 5 minutos, se burbujea N<sub>2</sub> por 2 minutos y finalmente se vuelve a trazar el polarograma.

NOTA: Para confirmar la señal se deberá realizar una adición de una solución estándar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con la previa inhibición de la enzima con 50 µL de azida de sodio 0.1 M

6. Interpolar el valor del Δi (Δi de la muestra – Δi de la muestra después de la adición de la catalasa) en la curva de calibración y obtener la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**II. MÉTODO INDIRECTO**

**a) Curva de calibración.**

1. Preparar una solución 100 µM a partir de una solución estándar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> previamente valorada con KMnO<sub>4</sub> normalizado.
2. Encender el equipo y en una celda se colocan 2 mL de una solución amortiguadora de Tris 0.1 M pH = 8, a la cual se le burbujea N<sub>2</sub> por 10 minutos, al término de este tiempo se realiza el polarograma correspondiente en las siguientes condiciones:

$$E_{in} = 0.05 \text{ V}$$

$$E_f = -0.52 \text{ V}$$

$$v_b = 10 \text{ mV/s}$$

$$\Delta E = 50 \text{ mV}$$

$$\text{tiempo de goteo} = 1 \text{ gota/seg}$$

$$\text{Sensibilidad de la intensidad de corriente: } 1 \text{ nA}$$

3. Hacer una adición de 50 µL de catalasa 1000 U, burbujear por un tiempo de 2 minutos, posteriormente realizar adiciones de 25 µL de la solución estándar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y monitorear la respuesta correspondiente a cada adición de la siguiente manera: primero

---

encender el registro, en el segundo 5 realizar la adición de la catalasa, agitar por 2 segundos y empezar el barrido de potencial al segundo 8.

4. Trazar la curva de calibración.

**b) Tratamiento de la muestra.**

1. Obtener aproximadamente 1.5 mL de una muestra de sangre, la cual debe recibirse en un tubo con 0.1 mL de heparina 10 U.
2. Centrifugar a 6000 r.p.m. durante 30 minutos.
3. Colocar en una celda 2 mL de la solución amortiguadora de Tris 0.1 M pH = 8 y burbujear N<sub>2</sub> por 10 minutos, al término de este tiempo se realiza el polarograma correspondiente al dominio de electroactividad en las condiciones antes mencionadas.
4. Tomar una alícuota de la muestra de 500 µL, verterla en el medio y trazar el polarograma.
5. Hacer una adición de 50 µL de catalasa 1000 U previamente sonicada por 15 minutos, siguiendo el patrón de tiempo antes mencionado.

**NOTA:**

- ❖ **Las muestras no deberán presentar hemólisis.**
  - ❖ **Para confirmar la señal se deberá realizar una adición de una solución estándar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**
6. Interpolarse el valor del  $\Delta i$  ( $\Delta i$  de la muestra después de la adición de la catalasa –  $\Delta i$  de la muestra –) en la curva de calibración y obtener la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



## 7.0 CONCLUSIONES

Debido a que el peróxido de hidrógeno tiene efectos biológicos adversos se requieren cada vez métodos más sensibles y selectivos para la cuantificación del mismo en las áreas clínica, de alimentos y ambiental.

El presente trabajo demuestra la posibilidad de determinar el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) utilizando la polarografía diferencial de pulsos, de manera directa e indirecta, en muestras de plasma de animales control y tratados, técnica que aún no ha sido reportada como una alternativa a otras metodologías reportadas.

Se realizó el desarrollo analítico, evaluando parámetros como amortiguador, matriz, porcentaje de recobro, intervalo lineal, entre otros; de donde a partir de las curvas de calibración  $\Delta i = f([H_2O_2])$  se encontraron las siguientes condiciones operatorias para lograr la determinación de este analito con calidad.

CONDICIONES PARA LA DETERMINACIÓN		
DIRECTA	PARÁMETRO	INDIRECTA
-0.65 a -1.4 V vs ECS	intervalo de potencial	0.0 a -0.52 V vs ECS
Tris 0.1 M pH = 8	amortiguador	Tris 0.1 M pH = 8
plasma-acetona	matriz	plasma
100 U	Concentración de enzima	100 U
22° C	Temperatura	22° C

Con las cuales se obtienen los siguientes parámetros estadísticos:

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS		
MÉTODO DIRECTO		MÉTODO INDIRECTO
$\Delta i = 3.03 \pm 0.09 [H_2O_2] + 0.13 \pm 0.07$	ecuación de calibración	$\Delta i = 6.0 \pm 0.1 [H_2O_2] + 2.4 \pm 0.2$
0.09 – 10.00 $\mu M$	intervalo lineal	0.10 – 6.65 $\mu M$
0.014 $\mu M$	límite de decisión	0.016 $\mu M$
0.027 $\mu M$	límite de detección	0.031 $\mu M$
0.090 $\mu M$	límite de cuantificación	0.010 $\mu M$
99.8	porcentaje de recobro	103.0
4.89 %	RSD	5.43 %

Estos métodos permiten distinguir entre los diferentes niveles de  $H_2O_2$  por lo cual las condiciones obtenidas fueron aplicadas en la determinación de muestras de plasma de animales a los que se les suministró un fármaco (metilamina o hidralazina) que modifica la concentración de  $H_2O_2$  como respuesta a dicha administración.

<i>Tipo de muestra</i>	<b>CONCENTRACIÓN (<math>\mu M</math>)</b>	
	<i>Determinación directa</i>	<i>Determinación indirecta</i>
Control	15.25 $\pm$ 0.85	15.32 $\pm$ 0.75
Estimuladas	23.17 $\pm$ 1.35	24.08 $\pm$ 0.97
Inhibidas	11.28 $\pm$ 0.47	10.73 $\pm$ 0.49

Ambas metodologías presentan ventajas comunes con respecto a otras reportadas en la literatura como son: límite de detección bajo, gran precisión, porcentajes de recobro muy cercanos a 100 y un tiempo de análisis pequeño, además de otras como la selectividad y pruebas de confirmación (adición de catalasa y de una solución estándar). Lo antes mencionado permite el análisis de calidad de un gran número de muestras. Pero, sin lugar a duda la mayor ventaja es que no se requiere utilizar un tratamiento drástico, por lo que resulta una metodología poco costosa y la pérdida de la muestra es mínima, lo que permite un ahorro en tiempo, costos y una disminución considerable de los residuos contaminantes. Lo anterior en contraste con las metodologías reportadas en donde se requieren grandes cantidades de disolventes orgánicos o reactivos con un grado de pureza elevado, además de que la muestra requiere un tratamiento drástico que puede conllevar a la pérdida del analito de interés, el cual se cuantifica de manera indirecta.

**8.0 BIBLIOGRAFIA**

1. "The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, drugs, and biologicals" 11<sup>th</sup> ed., Ed. MERCK & CO., INC. RAHWAY, N.Y., U.S.A., (1989).
2. ARANÉO A., "Química Analítica Cualitativa" Ed. Mc Graw Hill, México, (1981).
3. BECKMAN J.S., *Ann NY Acad. Sci.*, 738 : 69-75 (1994).
4. HALLIWEL B. y GUTTERIDGE J., *Biochem. J.* 219 : 1-14 (1984).
5. CÉSPEDES-CABRERA T. y SANCHEZ SERRANO D., *Rev. Cubana Cardiol.*, 14 (1) : 55-60 (2000).
6. RODRÍGUEZ-MELÉNDEZ, *Rev. Investigación Clínica*, 54 (1) : 77-83 (2002).
7. FREEMAN B.A. y GRAPO J.D., *Lab. Invest.*, 47 : 412-426 (1982).
8. GEBICKI S. y GEBICKI J.M., *Biochem. J.*, 289 : 743-749 (1993).
9. RICEEVANS C. y BURDON R., *Prog. Lipid Res.*, 37 : 37-110 (1993).
10. PRYOR W.A. Y CHURCH D.P., *Free Rad. Biol. Chem.*, 11 : 41-46 (1991).
11. RANDEPATH K., REDDY R., DANNA T.P., WATSON W.P., CRANE A.E. y RANDEPATH E., *Mut. Res.*, 275 : 355-366 (1992).
12. VLADIMIROVA O., O'CONNOR J., CAHILL A., ALDER H., BUTONI C. y KALMA B., *Multiple Sclerosis*, 4 : 219-224 (1998).
13. JACOB R.A., *Nutr. Rev.*, 15 : 755-766 (1995).
14. YU B.P., *Physiol. Rev.*, 74 : 139-163 (1994).
15. DESKUR E., PRZYWARSKA I., DYLEWICZ P., SZEZESNIA K.L., RYCHLEWSKI T., WILK M. y WYSOCKI H., *Int. J. Cardiol.*, 67 (3) : 219-224 (1998).
16. KAZMIERCZAK M., WYSOCKI H., WYKRETOWICS A. y MINEZYKOWSKI A., *Coron Artery Dis.*, 6 (1) : 65-69 (1995).
17. CAVAROCCHI N.C., O'BRIEN J.F., SOLIS E., PLUTH J., ORSZULAK T.A., KAYE M.P. y SCHAFF H.V., *Circulation*, 74 : III 134-137 (1986).
18. MARTÍNEZ-CAYUELA M., *Ars. Pharmaceutica*, 39 (1) : 5-18 (1998).
19. SWEI A., LACY F., DELANO F. A. y SCHMID-SCHÖNBEIN G.W., *Hypertension*, 30 : 1628-1633 (1997).
20. SCHWAKE A., ROSS B. y CAMMANN K., *Sensors and Actuators B*, 46 : 242-248 (1998).

21. GARJONYTE R. y MALINAUSKAS A., *Sensors and Actuators B*, 56 : 93-97 (1999).
22. ABREU R.M., SANTOS D. J. y MORENO A.J., *J. Pharmacol. and Exp. Ther.*, 295 (3) : 1022-1030 (2000).
23. LIU XIAOPING L. y ZWFIER J.L., *Free Radic. Biol. Med.*, 31 (7) : 894-901 (2001).
24. MATOS R.C., PEDROTTI J.J. y ANGNES L., *Anal. Chim. Acta*, 441 : 73-79 (2001).
25. EFTEKHARI A., *Talanta*, 55 : 395-402 (2001).
26. DOMÉNECH A. y ALARCÓN J., *Anal. Chim. Acta*, 452 : 11-22 (2002).
27. MIZUTANI F., YABUKI S., SAWAGUZZI T., HIRATA Y., SATO Y. y IIJIMA S., *Sensors and Actuators B*, 76 : 489-493 (2001).
28. YABUKU S., MIZUTANI F. y HIRATA Y., *Sensors and Actuators B*, 65 : 49-51 (2000).
29. LI B., ZHANG Z. y ZHAO L., *Anal. Chim. Acta*, 445 : 161-167 (2001).
30. VALCÁRCEL M. y RIOS A., “La calidad en los laboratorios Analíticos” Ed. Reverté S.A., España, (1992).
31. EUROCHEM “The fitness for Purpose of Analytical Methods. A laboratory Guide to method Validation and Related Topics” EUROCHEM Secretariat, Teddington, Middlesex (1998).
32. IUPAC, Guidelines on Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories. Ed. M. Thompson y R. Wood. *Pure Appl. Chem.* 67 : 649 (1995).
33. BARD, J. and FAULKNER, L.R. “Electrochemical methods. Fundamentals and applications” 2da. ed., Ed. John Wiley & Sons Inc., U.S.A., (2001).
34. GALUS, Z., “Fundamentals of Chemical Analysis” Ed. John Wiley & Sons, Poland, (1980).
35. “La ciencia más allá del aula”, U.N.A.M., (2003).
36. “Métodos Analíticos – VALIDACIÓN”, Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la salud. SSA.
37. MILLER J.C. Y MILLER J.N. “Estadística para Química Analítica” 2da. ed., Ed. Addison-Wesley Iberoamericana, México, (1993).

- 
38. MASSART D.L., DIJKSTRA A. y KAUFMAN L. "Techniques and instrumentation in Analytical Chemistry. Evaluation and Optimization of Laboratory Methods and Analytical Procedures. A Survey of Statistical and Mathematical Techniques" Vol. 1 Ed. Elsevier Scientific publishing Company Netherlands, (1980).
  39. DEVLIN, Thomas M., "Bioquímica" 3era. ed., Ed. Reverte, S.A., España, (2000).
  40. VOET, et.al. "Bioquímica" 3era. ed., Ed. Reverté, S.A., España, (2000).
  41. NAHUM A., WOOD L.D.H. y SENAJDER J.I., *Free Radic. Biol. Med.*, 6 : 479-484 (1998).
  42. JIN-MING L., HAJIME A. y MASAAY Y., *Anal. Chim. Acta*, 371 : 171-176 (1998).
  43. LOBNIK A. y ČAJLAKOVIĆ, *Sensors and Actuators B*, 74 : 194-199 (2001).
  44. XIAO-LAN CH., DONG-HUI L., HUANG-HAO Y., QING-ZHI Z., HONG Z. y JIN-GOU X., *Anal. Chim. Acta*, 434 : 51-58 (2001).
  45. LENARCZUK T., GLAB S. y KONCKY R., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 26 : 163-169 (2001).
  46. TANG B., WANG Y., SUN Y. y SHEN H.X., *Spectrochim. Acta Part A*, 58 : 141-148 (2002).
  47. KIETZMAN D., KAHL R., MÜLLER M., BURCHARDI H. y KETTLER D., *Intensive Care Med.* 19 (2) : 78-81 (1993).
  48. ZAPPACOSTA B., PERSICILLI S., MORMILE F., MINUCCI A., RUSSO A., GIARDINA B. y DE SOLE P., *Clin. Chim. Acta*, 310 : 187-191 (2001).
  49. PAŹDZIOCH-CZOCHRA M. y WINDENSKA A., 452 : 177-184 (2002).
  50. ZHOU G-J., WANG G., XU J-J. y CHEN H-Y., *Sensors and Actuators B*, 73 : 334-339 (2002).
  51. PAPPAS A., STALIKAS C., FIAMEGOS Y. y KARAYANNIS M., *Anal. Chim. Acta*, 455 : 305-313 (2002).
  52. VELJOVIC-JOVANOVIC S., NOCTOR G. y FOYER C.H., *Plant Physiol. Biochem.* 40 : 501-507 (2002).
  53. KOUZUMA T., USAMI T., YAMAAKOSHI M., TAKAHASHI M. y IMAMURA SH., *Clin. Chim. Acta*, 324 : 61-71 (2002).
-

- 
54. XIAO-LAN CH., LING W., HUANG-HAO Y., QING-ZHI Z. y JIN-GOU X.,  
*Talanta*, 57 : 453-460 (2002).
55. ARAKAWA H., KANEMITSU M., TAJIMA N. y MAEDA M., *Anal. Chim. Acta*,  
472 : 75-82 (2002).
56. WADA M., INOUE K., IHARA A., KISHIKAWA N., NAKASHIMA K. y KURODA  
N., *J. Chromatogr. A.*, (2002) (in press).
57. LORENZANA-JIMÉNEZ M. y et.al. "Influencia de la hidralazina y metilamina sobre  
la concentración de peróxido de hidrógeno en el plasma de ratas" XLV Congreso  
Nacional de Ciencias Fisiológicas, Colima, (2002).
58. HARRIS D.C., "Análisis Químico Cuantitativo" 2da. ed., Ed. Reverté S.A.,  
Barcelona, (2001).

---

## ANEXO 1. Alternativas para la cuantificación de $H_2O_2$ empleando técnicas no electroquímicas.

Descripción breve de algunas metodologías propuestas para la cuantificación de peróxido de hidrógeno.

- En 1989 Avi Nahum determinaron este analito por una reacción con ácido p-hidroxifenil acético o L-tirosina como sustratos y una reacción posterior con isoluminol, utilizando un equipo de HPLC con detector espectrofotométrico donde se utiliza una columna LC18 y LCNH2. [41]
- En 1998 se realizó dicha determinación en agua de nieve por quimioluminiscencia al reaccionar con peryodato en medio alcalino, el límite de detección reportado es de  $5 \times 10^{-9}$  M, por lo cual esta metodología cuantifica al nivel de trazas. [42]
- Un sensor óptico ha sido preparado al incorporar azul de meldona en capas de sol-gel, escogido por su transparencia óptica, de rápida respuesta en un intervalo de concentraciones de  $10^{-8}$  a  $10^{-1}$  M, de gran estabilidad mecánica, químicamente inerte y estable por un período de 20 días. [43]
- Además hay reportes de un sistema empleando ftalocianina como sustrato en una reacción con  $H_2O_2$  catalizada por peroxidasa con un intervalo lineal desde  $2 \times 10^{-9}$  hasta  $2 \times 10^{-7}$  M y un límite de detección de  $1.4 \times 10^{-9}$  M; utilizando como sistema de detección la quimioluminiscencia a 610 y 678 nm. [44]
- En el 2001 se reportó un sensor óptico a base de azul de Prusia a 720 nm probado en medicinas –analgésicos y vitaminas- con intervalo lineal de 0.2 hasta 8 mM. [45]
- También se han desarrollado metodologías que permiten el uso de 2-hidroxi-1-naftaldehído como sustrato monitoreando la reacción con  $H_2O_2$  por la peroxidasa de rábano al utilizar la espectrofluorometría de onda de emisión como técnica evaluando la respuesta a 414 nm y 296 nm con aplicación en la determinación de peróxidos en polietilenglicol. [46]
- Además Zappacosta et al. utilizan el método reportado por Kietzman et al. [47] y lo aplican para cuantificar el peróxido de hidrógeno en muestra de condensado de aliento exhalado utilizando la técnica de quimioluminiscencia. [48]
- En una publicación reciente Paździoch-Czochra M. y Windańska A. proponen la determinación de  $H_2O_2$  por espectrofluorometría como una forma de cuantificar la

---

actividad de un barredor de radicales libres de oxígeno en té e infusiones de hierbas a pH = 7.5 y 1 U de peroxidasa. [49]

- Guo-Jun Z. et al. de la Universidad de China hicieron su aportación a la determinación de dicho analito con el diseño de un reactor que no necesita reactivos para la quimioluminiscencia basado en la inmovilización de peroxidasa de rábano sobre una membrana de quitosana biocompatible y un reactor posterior donde el luminol fue inmovilizado sobre resinas de intercambio iónico en un tubo de vidrio, lugar en donde se realiza la detección, los volúmenes de muestra son de 30  $\mu\text{L}$  y se tiene dos regiones lineales de trabajo  $10^{-7}$  a  $10^{-5}$  M y  $10^{-5}$  a  $10^{-3.7}$  M con un límite de detección de  $10^{-8}$  M y una DER de 1.1%, la estabilidad del sensor es de 3 meses. [50]
- En ese mismo año, en el departamento de Química de la Universidad de Grecia se realizó la determinación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  del orden de concentraciones nanomolares usando un sistema de inyección combinado con un reactor enzimático, las condiciones operatorias fueron: amortiguador de fosfatos 0.1 M,  $\lambda = 590$  nm, con un intervalo lineal de 20-700 nM, temperatura de 25°C y una desviación estándar de 1.7%, este método está basado en la reacción en la cual una sustancia colorida se forma por oxidación de dos cromógenos, dicho método fue probado en procesos de limpieza. [51]
- Sin embargo, siempre se ha puesto en duda acerca de la veracidad de los métodos, así Veljovic-Jovanovic S., Noctor G. y Foyer C.H., examinaron la autenticidad de dos métodos para la determinación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el tejido de las hojas, demostrando que el ácido ascórbico presente del extracto de hojas interfiere en dicha determinación. La reacción monitoreada es un ensayo cromogénico acoplado a peroxidasa donde el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se determina por oxidación de 3-metil-2-benzotiazolium hidrazona y ácido 3-dimetilamino benzoico a 590 nm; además se estudia una segunda metodología utilizando la técnica de quimioluminiscencia por reacción con el luminol, cuya metodología argumenta que tiene una notable mejoría por la adición de ferricianuro al incrementarse la señal debida a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , elevando así la sensibilidad de la metodología en un intervalo lineal de 40-120 nmol/g. [52]
- También Kouzuma T. et al. desarrollaron un método enzimático para medir albúmina en muestras biológicas donde se genera  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el cual es medido por reacción con un



---

cromógeno y una peroxidasa; la medición de la respuesta se efectúa a 546 y 700 nm.

[53]

- Chen et al. proponen el uso de tetrasulfonftalocianato de hierro para esta determinación, con monitoreo por fluorescencia que permite detectar  $5 \times 10^{-9}$  M a 414 y 323 nm. Los resultados demuestran que este compuesto cataliza la reacción fluorogénica entre  $H_2O_2$  y L-tirosina, realizada exitosamente a pH=10.5 en un tiempo de reacción de 15 minutos y a una temperatura de 25°C. [54]
- En el estudio realizado por Arakawa et al. se determinaron catecolaminas, vía la reacción de  $H_2O_2$  con un cromógeno utilizando la quimioluminiscencia como técnica de detección. Dicha metodología permite la cuantificación de este compuesto en un intervalo de  $10^{-7}$  a  $10^{-3}$  M con un límite de detección de  $10^{-8}$  M en muestras de té, tiene un tiempo de reacción de 30 minutos, el pH varía de acuerdo a la catecolamina (pH=10 ó 13) y el reactivo cromógeno es bis(2,4,5-triclorofenil) oxalato. [55]
- Usando una radiación UV en línea post-columna se determinaron peróxidos orgánicos y peróxido de hidrógeno por HPLC con detección por quimiluminiscencia con peroxioxalato, las condiciones para la determinación fueron pH = 7.5, con una concentración de 0.5 mM, una velocidad de flujo de 0.5 mL/min, una composición de fase móvil de 60% acetonitrilo y un límite de detección de 1.1  $\mu$ M. [56]

## ANEXO 2. Calibración del material volumétrico

Descripción breve de la metodología para la calibración del material volumétrico.

### Pipeta volumétrica (2 mL).

- Pesar un vaso de precipitados seco.
- Tomar el volumen de agua destilada correspondiente a la pipeta volumétrica.
- Medir la masa del vaso de precipitados que contiene el agua.
- Realizar por este procedimiento por triplicado.

### Bureta (25 mL).

- Llenar la bureta con agua destilada.
- Verter el volumen contenido en la bureta lentamente en un vaso de precipitados previamente pesado realizando adiciones de 5 mL y midiendo la masa del vaso después de cada adición.
- Realizar por este procedimiento por triplicado.

### Matraces volumétricos (25 y 50 mL).

- Pesar el matraz volumétrico.
- Llevar la base del menisco al centro de la señal de enrase con agua destilada.
- Pesar nuevamente el matraz volumétrico conteniendo el agua.
- Realizar por este procedimiento por triplicado.

**NOTA:** En todo momento es indispensable medir la temperatura del agua que se utiliza para la calibración.

### Resultados de la calibración del material volumétrico utilizado.

En la **tabla 21** se presenta los resultados de la calibración del material volumétrico utilizado; para la posterior determinación de la incertidumbre en la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Tabla 21** Calibración del material volumétrico utilizado.

MATERIAL	VOLUMEN
Pipeta volumétrica de 2 mL	2.00 <sub>1</sub> ± 0.002
Matraz aforado de 25 mL	24.9 <sub>2</sub> ± 0.02
Matraz aforado de 50 mL	49.9 <sub>7</sub> ± 0.02

Las cartas de corrección de volumen de la bureta se muestran en el **anexo 3** y la incertidumbre en la balanza es de: 0.1 mg.

La estimación de los errores en la preparación de la solución estándar nos permite conocer la incertidumbre en la concentración de  $H_2O_2$  que es  $100 \pm 0.13 \mu M$  con una desviación estándar es de 0.125, resultado de evaluar la propagación de errores aleatorios bajo el siguiente modelo.

$$\sigma_y/y = [(\sigma_a/a)^2 + (\sigma_b/b)^2 + (\sigma_c/c)^2 + (\sigma_d/d)^2]^{1/2}$$

en donde a, b, c y d son los promedios y  $\sigma_{a,b,c}$  y  $\sigma_d$  es la desviación estándar de a, b, c y d respectivamente.

A partir de esta información podemos saber de que variable, dependiente o independiente, proviene la mayor incertidumbre.

En la **tabla 22** se muestra el intervalo de confianza para una serie de datos:

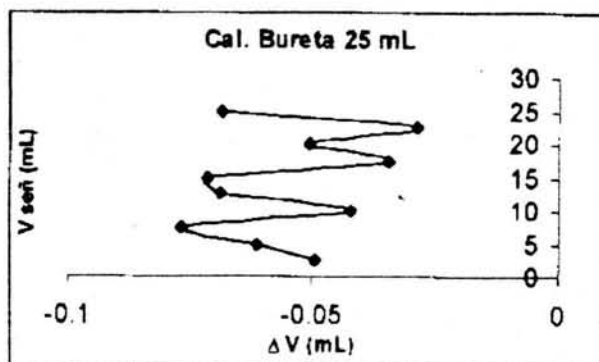
MÉTODO DIRECTO	
$[H_2O_2]$ ( $\mu M$ )	$\Delta i$ (nA)
$0.85 \pm 0.12$	$3.58 \pm 0.5$
$1.67 \pm 0.12$	$7.08 \pm 0.5$
$2.48 \pm 0.12$	$10.50 \pm 0.5$
$3.26 \pm 0.12$	$13.92 \pm 0.5$
$4.03 \pm 0.11$	$20.42 \pm 0.5$

MÉTODO INDIRECTO	
$[H_2O_2]$ ( $\mu M$ )	$\Delta i$ (nA)
$1.02 \pm 0.13$	$10.28 \pm 0.5$
$2.02 \pm 0.13$	$16.00 \pm 0.5$
$2.99 \pm 0.12$	$22.64 \pm 0.5$
$3.94 \pm 0.12$	$27.28 \pm 0.5$
$4.87 \pm 0.13$	$32.85 \pm 0.5$

como se puede apreciar en la **tabla 22** la mayor incertidumbre proviene del eje "y".

### ANEXO 3. Calibración de la bureta de 25 mL.

La bureta de 25 mL presenta una desviación estándar de 0.1140 y un D.S.R. de 1.94%; la carta correspondiente de corrección de volúmenes se presenta a continuación:



### ANEXO 4. Tratamiento de las muestras

Se utilizaron ratas Wistar, macho de 200 a 250 g de peso, divididas en cuatro grupos.

El primer grupo se utilizó como control, por lo cual no hay administración de ningún fármaco.

El segundo recibió hidralazina en dosis única de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso por vía intravenosa.

El tercero recibió la metilamina a la dosis de 200  $\text{mg}/\text{kg}$  por vía intrapeneana.

Finalmente, al cuarto grupo se le administró metilamina a la misma dosis y vía, 2 horas antes de la administración de la hidralazina.

El tiempo de acción de cada fármaco una vez suministrados a los animales fue de 2 horas para la metilamina y de 15 minutos para la hidralazina, transcurrido este tiempo de administración se anestesió a los animales con uretano y cloralosa a la dosis de 800 y 50  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso respectivamente, en volumen de 1 mL por cada 100 g de peso y se les tomó una muestra de sangre de aproximadamente 4 mL por punción cardiaca.

Se depositó 1 mL de sangre en cada tubo que contiene 0.1 mL (10 U) de heparina como anticoagulante. En los casos en los que se adicionó un agente precipitante de proteínas se mantuvo la relación de 1:2.5 en el caso de acetona y de 1:2 para metanol y acetonitrilo.

Finalmente los tubos que contenían a las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 6000 rpm. [57]

**ANEXO 5. Determinación volumétrica de peróxido de hidrógeno.**

El permanganato de potasio se estandariza con oxalato de sodio seco que se disuelve en  $H_2SO_4$  1M, se efectúa una adición del 90-95% del volumen necesario de  $KMnO_4$ , a temperatura ambiente, y la valoración se termina a una temperatura de 55-60°. Se resta el valor del blanco, para tener en cuenta la cantidad de titulante que tinte la disolución. [58]

**ANEXO 6. Análisis de residuos para la determinación de peróxido de hidrógeno por método directo.**

Concentración	Valor obtenido	Pronóstico para Y	Residuos	Pronóstico para Y	Residuos	Pronóstico para Y	Residuos
1.0210	3.0	3.3831	-0.3831	3.2207	-0.2207	3.24476066	-0.24476066
2.0171	6.5	6.3441	0.1559	6.2344	0.2656	6.24982491	0.25017509
2.9892	9.5	9.2338	0.2662	9.1754	0.3246	9.18247797	0.31752203
3.9381	12.0	12.0547	-0.0547	12.0464	-0.0464	12.045306	-0.04530596
4.8647	15.0	14.8092	0.1908	14.8499	0.1501	14.8407733	0.15922671
5.7698	17.0	17.4996	-0.4996	17.5882	-0.5882	17.5712297	-0.57122975
6.6540	20.0	20.1282	-0.1282	20.2635	-0.2635	20.2389171	-0.2389171
7.5182	23.0	22.6970	0.3030	22.8780	0.1220	22.8459752	0.15402481
8.3629	25.5	25.2081	0.2919	25.4338	0.0662	25.3944477	0.1055523
9.1889	28.0	27.6634	0.3366	27.9328	0.0672	27.8862875	0.11371251
9.9967	30.5	30.0648	0.4352	30.3768	0.1232		
10.7870	31.5	32.4139	-0.9139				

**ANEXO 7. Cuadrado de los residuos para 12, 11 y 10 observaciones en la determinación de peróxido de hidrógeno por método directo.**

Observación	Cuadrado de los residuos		
1	0.1468	0.0487	0.0599
2	0.0243	0.0706	0.0626
3	0.0709	0.1054	0.1008
4	0.0030	0.0022	0.0021
5	0.0364	0.0225	0.0254
6	0.2496	0.3460	0.3263
7	0.0164	0.0694	0.0571
8	0.0918	0.0149	0.0237
9	0.0852	0.0044	0.0111
10	0.1133	0.0045	0.0129
11	0.1894	0.0152	
12	0.8353		
suma	1.8623	0.7037	0.6819

**ANEXO 8. Análisis de residuos para la determinación de peróxido de hidrógeno por método indirecto.**

Concentración	Valor obtenido	Pronóstico para Y	Residuos	Pronóstico para Y	Residuos	Pronóstico para Y	Residuos
1,0210	10,0	10,1607	-0,1607	9,7884	0,2116	9,7488	0,2512
2,0171	15,0	15,8598	-0,8598	15,6826	-0,6826	15,6678	-0,6678
2,9892	22,0	21,4215	0,5785	21,4349	0,5651	21,4441	0,5559
3,9381	27,0	26,8508	0,1492	27,0502	-0,0502	27,0830	-0,0830
4,8647	32,5	32,1524	0,3476	32,5334	-0,0334	32,5891	-0,0891
5,7698	38,0	37,3307	0,6693	37,8890	0,1110	37,9672	0,0328
6,6540	43,0	42,3899	0,6101	43,1215	-0,1215		
7,5182	46,0	47,3342	-1,3342				

**ANEXO 9. Cuadrado de los residuos para 8, 7 y 6 observaciones en la determinación de peróxido de hidrógeno por método indirecto.**

Observación	Cuadrado de los residuos		
1	0,0258	0,0448	0,0631
2	0,7392	0,4660	0,4459
3	0,3346	0,3193	0,3090
4	0,0223	0,0025	0,0069
5	0,1208	0,0011	0,0079
6	0,4480	0,0123	0,0011
7	0,3722	0,0148	
8	1,7800		
suma	3,8430	0,8609	0,8339

**ANEXO 10. Comparación de ambos métodos [36].**

A continuación se presentan las ecuaciones para la evaluación de criterios de los parámetros que nos servirán para establecer esta igualdad.

**A) Repetibilidad**

$$\text{LSIC} = (\sigma_1^2 / \sigma_2^2) * F$$

$$\text{LIIC} = (\sigma_1^2 / \sigma_2^2) * 1 / F$$

F = (N<sub>1</sub>-1) grados de libertad en el numerador y (N<sub>2</sub>-1) grados de libertad en el denominador.

**B) Exactitud al 100% y linealidad del método (porcentaje recuperado).**

Caso 1. Los métodos tienen la misma repetibilidad.

$$\sigma_P = [((N_1-1) \sigma_1^2 - (N_2-1) \sigma_2^2) / (N_1 + N_2 - 2)]$$

$$\text{LSIC} = (R_1 - R_2) + t * \sigma_P * (1/N_1 + 1/N_2)^{1/2}$$

$$\text{LIIC} = (R_1 - R_2) - t * \sigma_P * (1/N_1 + 1/N_2)^{1/2}$$

$$t = (N_1 + N_2 - 2) \text{ grados de libertad.}$$

**C) Linealidad del método (cantidad adicionada – cantidad recuperada).**

$$\sigma_E^2 = [(\Sigma y_1^2 - m_1 \Sigma xy_1 + b_1 \Sigma y_1) + (\Sigma y_2^2 - m_2 \Sigma xy_2 + b_2 \Sigma y_2)] / (t_1 n_1 + t_2 n_2 - 4)$$

Pendientes de la cantidad adicionada – cantidad recuperada

$$\sigma_{dm}^2 = \sigma_E^2 * [ 1 / (\Sigma x_1^2 - (\Sigma x_1)^2 / (n_1 t_1)) + (1 / (\Sigma x_2^2 - (\Sigma x_2)^2 / (n_2 t_2))) ]$$

$$\text{LSIC} = (m_1 - m_2) + t * (\sigma_{dm}^2)^{1/2}$$

$$\text{LIIC} = (m_1 - m_2) - t * (\sigma_{dm}^2)^{1/2}$$

$$t = t_1 n_1 + t_2 n_2 - 4$$

Ordenadas al origen de la cantidad adicionada – cantidad recuperada

$$\sigma_{do}^2 = \sigma_E^2 * [ 1 / n_1 t_1 + 1 / n_2 t_2 + (\Sigma x_1)^2 / (n_1^2 t_1^2 (\Sigma x_1^2 - (\Sigma x_1)^2 / n_1 t_1)) + (\Sigma x_2)^2 / (n_2^2 t_2^2 (\Sigma x_2^2 - (\Sigma x_2)^2 / n_2 t_2)) ]$$

$$\text{LSIC} = (b_1 - b_2) + t * (\sigma_{do}^2)^{1/2}$$

$$\text{LIIC} = (b_1 - b_2) - t * (\sigma_{do}^2)^{1/2}$$

$$t = t_1 n_1 + t_2 n_2 - 4$$

**ANEXO 11. ANOVA de dos factores [37,38].**

El ANOVA (Análisis de Varianza) es la prueba estadística que permite la separación de las tres fuentes de variación: variación entre bloques, variación entre tratamientos y variación aleatoria debida al error experimental.

Las fórmulas para el cálculo de la variación de las tres fuentes diferentes se dan en la siguiente tabla:

<b>FUENTE DE VARIACIÓN</b>	<b>SUMA DE CUADRADOS</b>	<b>GRADOS DE LIBERTAD</b>	<b>CUADRADO MEDIO</b>
Entre filas	$\sum_i T_i^2 / nc - C$	$r - 1$	Suma de cuadrados / grados de libertad
Entre columnas	$\sum_j T_j^2 / nc - C$	$c - 1$	
Interacción	por diferencia	por diferencia	
Residuos	$\sum x_{ijk}^2 - \sum T_{ij}^2 / n$	$rc (n - 1)$	
Total	$\sum x_{ijk}^2 - C$	$rcn - 1$	

donde:

$n$  = número de mediciones repetidas en cada celda

$r$  = número de filas

$c$  = número de columnas

$C$  = término de corrección =  $T^2 / nrc$

$T_i$  = total de la fila  $i$ -ésima

$T_j$  = total de la columna  $j$ -ésima

$T$  = gran total

$x_{ijk}$  =  $k$ -ésima réplica en la  $i$ -ésima fila y  $j$ -ésima columna

$T_{ij}$  = total para la celda de la  $i$ -ésima fila y  $j$ -ésima columna.