



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“DISEÑO, CONSTRUCCION Y CARACTERIZACION DE UNA
MICROCELDA ELECTROANALITICA PARA LA
CUANTIFICACION DE GLUCOSA CON GLUCOSA
OXIDASA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

EDGAR ALEJANDRO MEDINA TORRES



MEXICO, D.F.

**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

2004



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 **Profa. Rebeca Ugalde Vargas**

Vocal Prof. **Prof. Pedro Villanueva González**

Secretario **Prof. Alejandro Baeza Reyes**

1er sup. **Profa. Gloria García Ramírez**

2do sup. **Profa. Thalina Alejandra Rodríguez Fernández**

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Química microanalítica de Investigación y Enseñanza Experimental.
Facultad de Química, UNAM.

Asesor: Dr. Alejandro Baeza Reyes

Sustentante: Edgar Alejandro Medina Torres

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Edgar Alejandro Medina Torres', is written over two horizontal lines. The signature is stylized and somewhat illegible due to its cursive nature.

*A MIS PADRES
Y A MIS HERMANOS*

*En especial a la memoria
de mi hermano René...*



AGRADECIMIENTOS

A mis padres Carmen Torres Vázquez y Alejandro Medina Morales iiiGRACIAS!!!, por guiarme y acompañarme en este sendero de la vida, por aconsejarme, por hacerme saber de todas las maneras posibles que en la vida se lucha y se sacrifican algunas cosas, pero siempre aspirando a mejores oportunidades, sin olvidar el lugar de donde vienes, a sentirme orgulloso por lo que soy y no por lo que tengo, a ser humilde y a saber agradecer a todas aquellas personas que aportan algo a la diaria experiencia de vivir y aprender.

A mis hermanos René (q.e.p.d.), Jorge y Diana porque su presencia en mi vida ha sido gratificante y enriquecedora pues son grandes pilares de mi vida, porque en sus sonrisas y miradas han sabido compartir conmigo la responsabilidad de vivir y aprender, por regalarme innumerables momentos de risas y llantos, por toda esa generosidad con la que me han entregado parte de sus vidas y por aceptarme junto a ellos en todo momento iiiGRACIAS!!!.

Al Dr. Alejandro Baeza, por ser profesor, compañero y amigo; por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por el apoyo brindado en los momentos mas difíciles de mi vida, por todas las enseñanzas vertidas a lo largo del trabajo diario y por hacer constar que en la vida hay que hacer todo con pasión.

A mis compañeros de laboratorio Juan Manuel, Adrián, Xochiquetzal, Lalito, Tsui Ling y Paty, por compartir sus vidas y hacer mas ameno el trabajo y porque en ellos siempre he encontrado a grandes seres humanos y amigos.

A Maribel, Enrique, Zeus y Jorge amigos de toda la vida, por mantener ese lazo de amistad a pesar de la distancia y el tiempo.

A los Botados (Víctor, Rodrigo, Ricardo, "Feyo" y Ariel) por lo vivido y lo cantado, por las miles de historias contadas y los eternos silencios para escuchar al amigo, por hacer de una canción algo mas que un retrato de vida, por hacer la vida desde el canto.

A Montsse, Virginia, Minda, Paola Perez-Rea, Tere, Rafael, Carlitos, Caro, Luz, Diana, Karla y Nestor (todos de Prepa 3) por permitirme ser parte de ellos y por nunca dejarme olvidar quienes somos y hacer mas fácil esa transición en una etapa tan determinante en mi vida.

A mi fraccion muy particular de la Facultad de Química, Arcelia, Velia, Mirna, Jaimito, Katy, Jessica, Memo (q.e.p.d), Isaac, Shelhua, "Manto", Naty, Paola, Liliana, Atahualpa, Daniel, Raúl, Chio, Diana, Mirsa, Nancy, Juan, Ingrid, Katy Sánchez, Adriana, Hebe, Dulce Islas, Luz, Chayito, Zoraima, Queto, Vianey, Estefanía, Ángel, Brenda, Griselda, Octavio, Luisa, Cristina, Ricardo, Vany, Liz, Lety, Bety, Hugo, Mario, Israel, Lilia, Paty, Mayra, Tayde, por la generosidad brindada y por hacer de esta breve estancia en la Universidad algo que nunca olvidaré; a mis AMIGOS MIL GRACIAS.

A mi familia, mi corazón y la mas alta de mis consideraciones por ser tan unidos, por estar siempre interesados y al tanto mi andar, por demostrar su apoyo y por luchar diariamente por mantener vivos e íntegros los lazos familiares y hacerme participe de todas las actividades aun cuando mi ausencias eran recurrentes por su respeto GRACIAS a cada uno de ellos.

A mi otra familia, Tio Fer y Nachita, a mis padrinos Antonio Cruz y Guadalupe Marañón por que sin su interés y los diversos apoyos y oportunidades ofrecidas simplemente todo hubiese sido mas difícil.

Finalmente mi agradecimiento a Ana Laura, por ser parte muy importante de mi vida, por hacerme vivir algo mas que la amistad idealizada, por entregarme su cariño, su comprensión y su apoyo, por estar aquí, por enseñarme a compartir y por hacerme entender que la comunicación, la tolerancia y el entendimiento son indispensables para seguir creciendo como seres humanos y para crecer con otros seres humanos.



INDICE

I. RESUMEN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Glucosa.....	4
2.1.1 Importancia clínica.....	5
2.1.2 Métodos tradicionales de cuantificación.....	9
2.2 Principios de electroquímica.....	12
2.2.1 Transporte de masa.....	16
2.2.2 Transporte de carga.....	18
2.2.3 Generalidades de los programas de perturbación.....	20
2.2.4 Voltamperometría.....	22
2.2.5 Cronoamperometría.....	23
2.3 Microsistemas de detección y cuantificación de analitos.....	23
III. HIPOTESIS.....	27
IV. OBJETIVOS.....	29
V. MATERIAL Y METODOS.....	31
VI. RESULTADOS.....	38
4.1 Construcción de la celda.....	39
4.2 Ensayo de una prueba con una celda ficticia en el micropolarografo de mínima instrumentación (MIMP).....	40
4.3 Valoración titulométrica de KMnO_4 con $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$	41
4.4 Valoración titulométrica de H_2O_2 "estandar" con KMnO_4 0.1 M.....	42
4.5 Trazado de voltamperogramas con el MIMP.....	43
4.6 Ensayos con el potencióstato/galvanostato PGP201 usando el programa voltamaster I.....	45
4.7 Cronamperometría aplicada al monitoreo de H_2O_2 estándar.....	48
4.8 Monitoreo del H_2O_2 generado "in situ".....	50
VII. ANALISIS DE RESULTADOS.....	53
VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	57
IX. BIBLIOGRAFIA.....	59
X. ANEXOS.....	62

I. RESUMEN

I. RESUMEN

El establecer metodologías y diseñar equipo para la cuantificación de analitos de diferentes naturalezas, es una de las principales ocupaciones y preocupaciones de la Química Analítica como disciplina científica; por otra parte, en la práctica diaria en el laboratorio clínico, el determinar las concentraciones de algunos compuestos es de vital importancia en el diagnóstico y tratamiento de variados estados patológicos.

La glucosa es una de las biomoléculas a monitorear de mayor relevancia, puesto que desordenes en su metabolismo, están relacionados con enfermedades como la diabetes mellitus, la cual es considerada una de las enfermedades de mayor impacto a nivel mundial y es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un problema de salud mundial.

Las altas tasas de crecimiento y prevalencia de esta enfermedad sobre todo en países en vías de desarrollo, son las razones por las cuales, se considera importante el desarrollar metodologías alternas a las establecidas actualmente; las cuales son muy costosas y emplean grandes cantidades de muestra.

En el presente trabajo se desarrolló una microcelda para cuantificar glucosa mediante el uso de la enzima glucosa oxidasa (GOD), en donde se aprovecha al peróxido de hidrógeno, (el cual es un producto de la degradación enzimática de la glucosa mediada por GOD).

La aportación de este trabajo experimental radica en el uso de técnicas electroquímicas diferentes a la polarografía como son la voltamperometría y la cronoamperometría, como las técnicas de detección; además del uso de material de bajo costo para construir las celdas y los electrodos.

En consecuencia tenemos una técnica que bien puede ser empleada como alternativa en la cuantificación de glucosa dentro de los laboratorios de enseñanza experimental de la Facultad de Química de la UNAM, específicamente en los laboratorios de Química Analítica Instrumental I y con el potencial de poder ser aplicada dentro del laboratorio clínico para la cuantificación de la glucosa sérica.

II. ANTECEDENTES

II. ANTECEDENTES

2.1 GLUCOSA.

Los carbohidratos son moléculas de gran importancia para los organismos vivos, ya que se tratan de las biomoléculas más abundantes y los podemos encontrar asociados a proteínas y lípidos dentro de la estructura de las diferentes membranas biológicas, como componentes esenciales de ácidos nucleicos y como la principal fuente de energía para que se lleven a cabo los diferentes procesos biológicos que realiza una célula.

Uno de los principales carbohidratos requeridos por el organismo humano es la glucosa, la cual se trata de una aldosa de seis átomos de carbono (aldohexosa). Estudios moleculares realizados a la D-glucosa revelaron que salvo los carbonos C(1) y C(6)⁽¹³⁾ el resto de los átomos de carbono de la glucosa son centros quirales; de esta manera se sabe que la D-glucosa es uno de los 16 estereoisómeros que se pueden encontrar en el grupo de las aldohexosas (Fig 2.1).

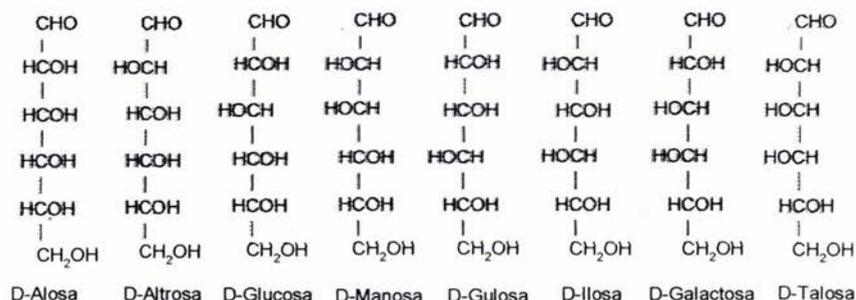


Fig 2.1 Estructuras de algunos monosacáridos integrantes de la familia de las aldohexosas. (Tomada de Lehninger A., *Bioquímica Las bases moleculares de la estructura y función celular*, 2ª Ed., Ediciones Omega S.A., Barcelona, 1994).

En el organismo las formas enediólica (Fig 2.2), y aldehídica de la glucosa se encuentran en equilibrio sin embargo en las condiciones de pH fisiológico predomina la forma enediólica.

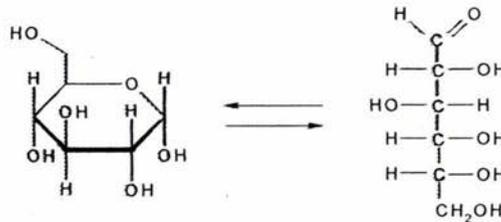


Fig 2.2 Equilibrio entre las formas enodiolica y aldehídica de la Glucosa.
(Tomada de Kaplan L., Pesce A: J., "Química Clínica Técnicas de Laboratorio-Fisiopatología-
Métodos de Análisis", Ed. Panamericana, Argentina, 1992).

En estas condiciones de equilibrio (aldehído/enodiol), se favorece la reducción y oxidación de la glucosa; esta propiedad química ha sido históricamente empleada en los diferentes métodos que se han desarrollado para cuantificar este carbohidrato.

2.1.1 IMPORTANCIA CLINICA

La glucosa es una de los compuestos que con mayor frecuencia se monitorean, ya sea a nivel prehospitalario, hospitalario o posthospitalario; esto debido a que los desequilibrios que se pueden presentar en este carbohidrato dentro del organismo están relacionados con una serie de patologías o estados patológicos.

Uno de las principales enfermedades relacionadas con desequilibrios en el metabolismo de glucosa y quizá la más conocida, es la diabetes mellitus, en la cual el aumento desproporcionado de las concentraciones de glucosa (hiperglicemia) por arriba de los 110mg/dL tiene consecuencias trascendentales en la salud de un individuo, ya que se afectan diferentes órganos y sistemas deteriorando el estado de salud de un individuo afectado por dicha enfermedad manera gradual; por lo antes mencionado un sujeto que presente dicho padecimiento, debe estar constantemente monitoreando sus niveles de glucosa en sangre.

En la práctica hospitalaria, se solicitan diariamente una gran cantidad de pruebas de cuantificación de glucosa en sangre; ya sea en pacientes que padecen alguno de los dos tipos de diabetes, a personas que padecen hipoglucemia, mujeres embarazadas, personas que realizan donaciones de sangre, personas que solicitan exámenes médicos, personas con hipertensión e hipotensión arterial, a pacientes hospitalizados ya sean candidatos a cirugía o que salieron de la misma, pacientes de terapia intensiva, personas con tumores, etc.

Prácticamente cualquier persona es candidata a realizarse una determinación de glucosa en sangre, por lo que dicha prueba se considera como de rutina de laboratorio clínico.

La diabetes mellitus es el padecimiento mas conocido en el que esta implicado un desorden en el metabolismo de la glucosa y es considerado por la Organización Mundial de la Salud como un problema de salud pública a nivel mundial.

En estudios que se han realizado en los últimos años a cargo de la misma OMS, se ha establecido que la prevalencia de diabetes a nivel mundial se incrementará en 1.6% para el año 2030 con respecto al estimado que se tiene de esta enfermedad para el año 2000⁽²⁰⁾ (Tabla 2.1).

Como una consecuencia la demanda de pruebas de glucosa realizadas en las diferentes instituciones de salud se verá incrementada (principalmente de carácter público).

Año	2000		2030		
	Lugar	País	Personas con diabetes (x 10 ⁶)	País	Personas con diabetes (x 10 ⁶)
1		India	31.7	India	79.4
2		China	20.8	China	42.3
3		E.U.A	17.7	E.U.A	30.3
4		Indonesia	8.4	Indonesia	21.3
5		Japón	6.8	Pakistán	13.9
6		Pakistán	5.2	Brasil	11.3
7		Federación Rusa	4.6	Bangladesh	11.1
8		Brasil	4.6	Japón	8.9
9		Italia	4.3	Filipinas	7.8
10		Bangladesh	3.2	Egipto	6.7

Tabla 2.1 Lista de países con el número más alto de casos estimados de personas con diabetes para los años 2000 y 2030. (Tomada de Wild S, Roglic G., Green A., et al, "Global prevalence of diabetes", Diabetes Care Vol. 27 Num. 5 Mayo, 2004).

Visto de manera más general, los estimados de prevalencia de casos de diabetes en el mundo se incrementarán el doble respecto del año 2000, siendo los países en vías de desarrollo los principales responsables del aumento en el número de personas afectadas por diabetes. Lo mencionado anteriormente se muestra con mayor claridad en las siguientes gráficas (Fig 2.3).

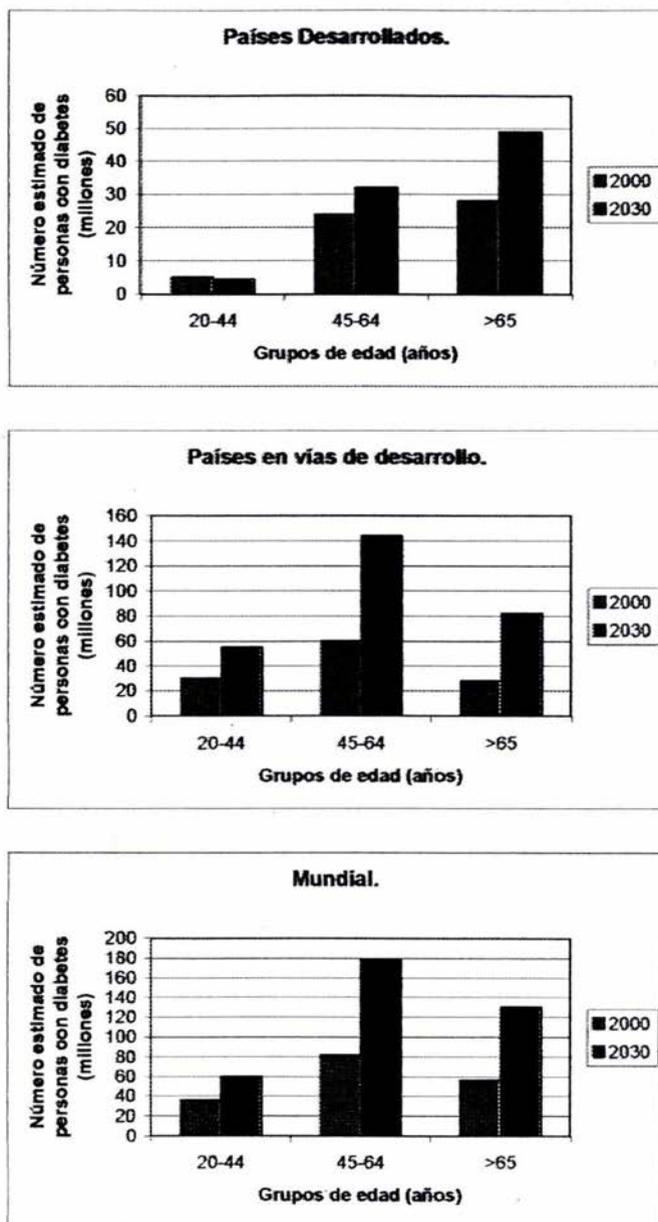


Fig 2.3 Número estimado de casos de personas con diabetes por grupo de edad en países desarrollados, en vías de desarrollo y casos mundiales. (Tomada de Wild S, Roglic G., Green A., et al, "Global prevalence of diabetes", Diabetes Care Vol. 27 Num. 5 Mayo, 2004)

En México, según la Encuesta Nacional de Salud ⁽¹⁶⁾ el promedio de prevalencia de diabetes representa el 7.5% en el grupo de personas mayores de 20 años. Siendo el grupo de 70-79 años de edad el más afectado con una prevalencia del 22.0%, mientras que el de menor afectación es el de 20-39 con un 2.3%.

Según estudios de la OMS, se espera que México ocupe el séptimo lugar a nivel mundial en mortalidad general.

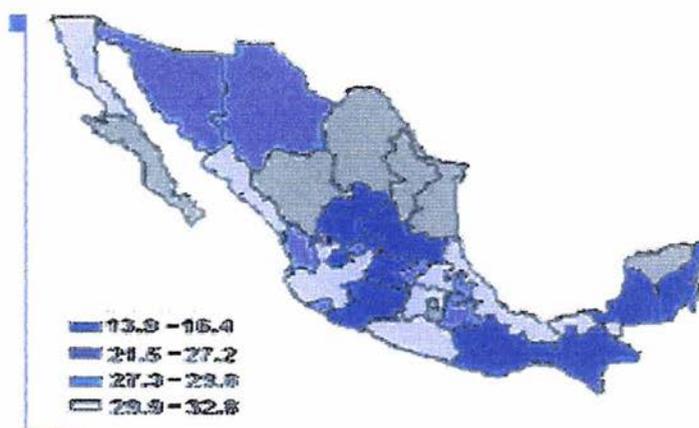


Fig 2.4 Prevalencia de diabetes mellitus en la población de 20 años y más de edad por entidad federativa. (Tomada de Sepúlveda J., Secretaría de Salud Encuesta Nacional de Salud 2000, México 2000.)

Ante tal panorama es importante el señalar el alto impacto que tiene esta enfermedad en el desembolso de recursos públicos únicamente en el seguimiento de las personas afectadas por la diabetes; puesto que una sola persona puede llegar a realizarse 156 monitoreos de glucosa en un año y que el número de estimado de diabéticos en México es de aproximadamente 4.8 millones (de los cuales sólo el 70% está conciente de su enfermedad). ⁽¹⁸⁾

Por lo anteriormente dicho se estima que se realizan alrededor de 524 millones de determinaciones de glucosa en sangre al año, en todo el territorio nacional.

2.1.2 METODOS TRADICIONALES DE CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA.

Los métodos mas antiguos establecidos para cuantificar glucosa en muestras sanguíneas, aprovechan la capacidad que tiene estas aldohexosa para reducir de manera directa a los iones cúpricos (Cu^{2+}) a iones cuprosos (Cu^{1+}); estos últimos, pueden formar óxido cuproso (Cu_2O) cuando se calienta la solución en donde ocurre la reacción.

Hay varios métodos empleados en la cuantificación de la glucosa, quizás los mas difundidos y usados para la cuantificación de este carbohidrato en sangre, son los de Folin-Wu (reducción del fosfomolibdato) o el de Somogyi-Nelson (reducción de arsenomolibdato), los cuales tienen como producto final complejos de color azul del molibdeno.

Otro método muy usado es el de la 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina o neocuproína (Tabla 2.2), dicho compuesto puede ser reducido por los iones Cu^{1+} ; dicho método en un inicio representó una ventaja sobre los métodos que se empleaban en ese momento puesto que tenía una mayor sensibilidad, pero estudios realizados posteriormente, revelaron que su especificidad era muy baja y por tal motivo cayo en desuso.

Las modificaciones al método de Benedict (reducción de cobre) han permitido que este siga siendo empleado en algunos laboratorios, si bien ya no como una prueba cuantitativa, si como un procedimiento semicuantitativo en orina; la razón por la cual se ha dejado de usar como una técnica de cuantificación, se debe a la falta de especificidad.

Sin embargo, la prueba de Benedict en conjunto con un análisis enzimático de mayor especificidad, bien puede emplearse como una prueba para examinar a una población ("screening").

La reacción del ferricianuro alcalino permite cuantificar a la glucosa sérica mediante la conversión de ferricianuro (amarillo) en ferrocianuro (incolore) en un medio alcalino por efecto de la glucosa, para realizar la cuantificación se correlaciona la desaparición de color con la presencia de glucosa (a mayor concentración de glucosa, menos colorida se verá la solución).

Posteriores modificaciones al método (1960-1970), permitieron que se determinara la cantidad de ferrocianuro que se originaba, haciéndolo reaccionar con iones férricos para formar el ferrocianuro férrico (azul de Prusia); sin embargo al igual que las técnicas anteriormente mencionadas la especificidad que tenía era baja y las interferencias con ácido úrico y creatinina resultaban ser significativas, alterando completamente los resultados.

La reacción de la *o*-toluidina (Tabla 2.2) se fundamenta en la capacidad que tienen diferentes aminas aromáticas para condensarse con el grupo aldehído de la glucosa para formar una glucosalina. Las ventajas que tiene este método sobre los ya mencionados son, un aumento en la exactitud, precisión y sensibilidad, sin embargo las desventajas que presenta son la falta de especificidad (interferencias positivas con urea y carbohidratos como manosa y galactosa) y el carácter carcinógeno de los reactivos.

La razón principal por la cual se decidió emplear a las enzimas como reactivos dentro de las técnicas de cuantificación de la glucosa, fue la falta de especificidad que presentaban los diferentes métodos que se usaban en el laboratorio clínico en ese momento.

Actualmente los procedimientos para determinar las cantidades de glucosa sérica que mas se emplean dentro del trabajo diario del laboratorio clínico requieren del uso de enzimas, ya que con su uso la especificidad de la reacción aumenta.

Las enzimas que se emplean con mayor frecuencia son la hexoquinasa y la glucosa oxidasa; el uso de estas enzimas aunado a la automatización de esos mismos procedimientos dieron como resultado, que las técnicas no solo ofrecieran una especificidad mayor que las otras técnicas no enzimáticas, sino que también las características de precisión aumentan.

El método de la hexoquinasa emplea dos reacciones acopladas; la primera corresponde a la fosforilación de las hexosas (glucosa) por adenosin trifosfato (ATP), y en la segunda la glucosa fosforilada (glucosa-6-fosfato), reacciona con la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, siendo el NADPH el producto final de esta segunda reacción enzimática y el blanco de medición de la técnica, puesto que por cada mol de glucosa reducida se genera un mol de NADPH (Tabla 2.2).

En este procedimiento la primera reacción no es del todo específica, dado que pueden ser otras las hexosas las que puedan ser fosforiladas y no sólo la glucosa, sin embargo las concentraciones séricas normales de esos azúcares no producen interferencias significativas. Este método ha sido propuesto como procedimiento estándar para la medición de glucosa, utilizando como muestra un filtrado libre de proteínas ⁽¹²⁾.

El método de la glucosa oxidasa (GOD) es quizá el más empleado hoy en día dentro del trabajo rutinario del laboratorio clínico para cuantificar glucosa. Este procedimiento emplea dos reacciones acopladas; la primera que es la responsable de la especificidad de la técnica, utiliza como sustrato de GOD a la glucosa presente en la muestra teniendo como producto final de esta primera reacción enzimática ácido glucórico y peróxido de hidrógeno (Fig 2.5) finalmente en la segunda reacción (la cual es inespecífica) el peróxido de hidrógeno se consumen en una reacción indicadora en la cual una segunda molécula es oxidada por la peroxidasa formándose un compuesto colorido el cual es finalmente determinado fotométricamente.

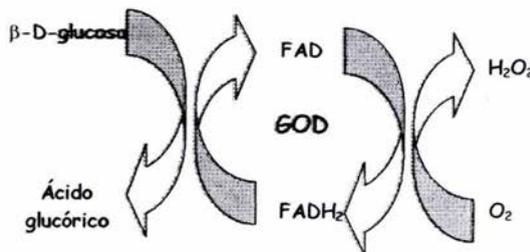


Fig 2.5 Reacción de oxidación de glucosa mediada por la enzima glucosa oxidasa (GOD).

Los compuestos empleados de manera más amplia en este método son:

3-metil-2-benzotiazolinonahidrazona/N,N-dimetilanilina (MBTA/DMA) y fenilaminofenazona (PAP).

Método	Tipo de análisis	Principio	Uso
A. ENZIMÁTICOS 1. Hexoquinasa (HK).	Cuantitativo, aumento de A a $\lambda=340\text{nm}$, C o PF	$\text{Glu} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{HK}} \text{Glu-6-P} + \text{ADP}$ $\text{Glu-6-P} + \text{NADP} \xrightleftharpoons{\text{G-6-P-D}} \text{6-Fosfogluconato} + \text{NADPH} + \text{H}^+$	Suero, Líquido cefalo raquídeo (LCR) y orina Automatizados
Glucosa Oxidasa (GOD) 2. Consumo de oxígeno (O ₂)	Cuantitativo, medición polarográfica con electrodo de O ₂	$\text{Glu} + \text{O}_2 \xrightleftharpoons{\text{GOD}} \text{Ácido glucónico} + \text{H}_2\text{O}_2$ H ₂ O ₂ Consumido en reacciones secundarias	Suero y LCR Semiautomatizado y completamente automatizado
3. Reacción acoplada (Trinder).	Cuantitativo con diversos tipos de colorantes como aceptores finales de O ₂ ; aumento de absorbancia; C o PF Semicuantitativo, selección con tiras, visual o fotometría de reflexión	$\text{Glu} + \text{O}_2 \xrightleftharpoons{\text{GOD}} \text{Ácido glucónico} + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{CoI-Red} \xrightleftharpoons{\text{Peroxidasa}} \text{CoI-Ox} + \text{H}_2\text{O}$	Suero, orina y LCR Usual y fácilmente automatizado Suero, orina Usado en todas las selecciones con tiras
B. 4. o-toluidina	Cuantitativo, aumento de absorbancia a 630 nm, generalmente de PF	$\text{o-toluidina} + \text{Glu} \longrightarrow \text{Glucosamina (color)}$	Suero u orina Raramente automatizado
C. Reducción del cobre 5. (Neocuprina)	Reacciones 5 a 7 Cuantitativo, PF	$\text{Cu}^{2+} + \text{Glu} \xrightarrow{\text{Calor/OH}} \text{Cu}^+$	Reacciones 5 a 7 Raramente usadas; de interés histórico
6. Fosfomolibdato (Folin-Wu)		$\text{Cu}^{2+} + \text{Glu} \xrightarrow{\text{Calor/OH}} \text{Cu}_2\text{O (color)}$	
7. Arsenomolibdato (Somogyi-Nelson)		$\text{Cu}^+ + \text{Mo}^{2+} \longrightarrow \text{Complejos azules de molibdeno}$	
8. Modificación de Benedict	Cualitativo, semicuantitativo	$\text{Cu}^{2+} + \text{Glu} \xrightarrow{\text{Calor/OH}} \text{Cu}_2\text{O}_{(s)} + \text{CuOH}_{(s)}$ [rojo] [amarillo]	Formulación de reacción 8, base de pruebas semicuantitativas para azúcares reductores totales en orina
9. Ferricianuro alcalino	Cuantitativo, disminución de absorbancia a 420 nm por consumo de ferricianuro	$\text{Fe(CN)}_6^{-3} \text{ [amarillo]} + \text{Glu} \xrightarrow{\text{Calor/OH}} \text{Fe(CN)}_6^{-4}$	Raramente usado; visto a veces en sistemas Technicon de interés histórico

Tabla 2.2 Diferentes métodos de análisis de glucosa que se han empleado y emplean actualmente en el laboratorio clínico. A= Absorbancia, C= Cinético, PF= Punto final. (Tomada de Kaplan L., Pesce A. J., "Química Clínica Técnicas de Laboratorio-Fisiopatología-Métodos de Análisis", Editorial Panamericana, Argentina, 1992).

2.2 PRINCIPIOS DE ELECTROQUÍMICA

El conocimiento de la composición o la cantidad exacta de una sustancia en una mezcla ha sido una de las principales preocupaciones y ocupaciones de la química como ciencia, tal interés es responsabilidad de la química analítica (Fig 2.3) ⁽³⁾, que como disciplina tiene como una de sus tareas, el diseñar y establecer metodologías para una cuantificación adecuada y eficiente de diferentes analitos.

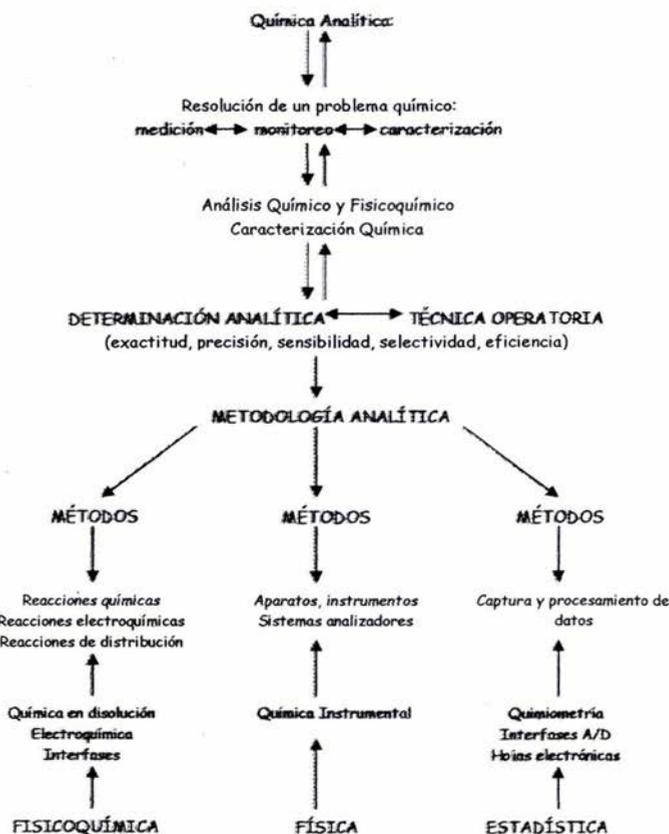


Fig. 2.3 Esquema conceptual de trabajo. (Tomada de Baeza A., "Sensores y Biosensores", Documentos de Apoyo para Química Analítica Instrumental I, UNAM, México, 2004. <http://mx.geocities.com/electroquimika>)

Para llevar a cabo la cuantificación de una molécula en particular (analito) pueden aprovecharse las propiedades fisicoquímicas de la misma, como su actividad eléctrica, su tamaño, las características ácido-base, configuración tridimensional, etcétera.

Dichas propiedades son medidas de dos formas una directa y otra indirecta; en la primera la medición se realiza sobre el analito, mientras que en la segunda la gama de opciones es mas amplia, pues el blanco de medición puede ser un producto de degradación (enzimática o no enzimática), una molécula implicada en la síntesis del analito (coenzimas o cofactores), o un producto derivado, del cual el analito sea el precursor, etcétera.

La justificación para emplear una metodología directa o indirecta, se encuentra en la técnica empleada para cuantificar y en el analito mismo; es decir si la técnica que se usa requiere de una molécula que absorba luz y nuestro analito no tiene esa capacidad, se tendrá que recurrir a otra molécula que tenga dicha característica y que este directamente relacionada con la presencia de nuestro analito (medición indirecta).

Es así como la electroquímica ha cobrado gran importancia por la variedad de aplicaciones que tiene en el estudio de mecanismos de reacción, determinación de la concentración de especies electroactivas y en el diseño de nuevos métodos de cuantificación y caracterización de múltiples moléculas ya sean de origen biológico como lo pueden ser metabolitos, productos de desecho, sustratos enzimáticos, o bien de origen sintético como fármacos, polímeros, entre otros.

En este sentido, resulta importante abordar la definición de electroquímica; la electroquímica se puede definir como:

“el estudio de los procesos de reacción que ocurren en la interfase conductor disolución, generados espontáneamente o por medio de una perturbación externa con el objetivo de resolver un problema de tipo químico”⁽⁴⁾.

Procesos de reacción: Son todo el conjunto de eventos que ocurren antes, durante y después de imponer una perturbación de tipo eléctrico” y estos se ejemplifican en la figura 2.4⁽⁴⁾.

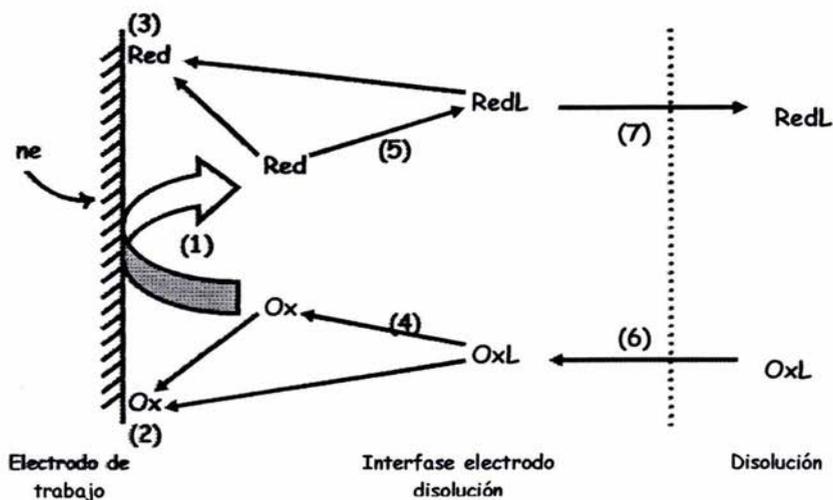


Fig 2.4 Procesos de reacción que ocurren al electrodo al imponer una diferencia de potencial diferente al potencial de equilibrio. (Tomada de Baeza A., Ortiz J., "Principios de electroquímica", Documentos de Apoyo para Química Analítica Instrumental I, UNAM, México, 2004. <http://mx.geocities.com/electroquimika>)

- (1) Reacción electroquímica, en este caso es la reducción de Ox: $Ox + ne^- \rightarrow Red$
- (2) Adsorción del oxidante libre o en forma de OxL, antes de reducirse.
- (3) Adsorción del reductor libre o en forma de RedL, después de producirse por reducción de Ox.
- (4) Disociación del complejo formado por el oxidante y la partícula L en solución, antes de que se reduzca.
- (5) Formación del complejo RedL (puede ser con cualquier otra partícula además de L) una vez producido el reductor al electrodo.
- (6) Transporte del oxidante complejo del seno de la disolución a la interfase electrodo disolución.
- (7) Transporte del reductor complejo de la interfase al seno de la disolución.

De todos los procesos que tienen lugar en el momento de iniciar un esquema de perturbación eléctrica, el que tiene mayor relevancia, es la reacción electroquímica, pues es este proceso el que nos proporciona la información que se requiere para cuantificar o caracterizar una molécula.

Esta reacción electroquímica es un tipo de reacción, en el cual ocurre una transferencia de electrones o iones a través de interfaces cargadas (metal-solución, solución-solución o membranas celulares) y cuyas características se mencionan a continuación.⁽⁴⁹⁾

- **Son reacciones en sistemas heterogéneos:** Estas ocurren en la interfase metal disolución, donde la disolución puede ser acuosa, no acuosa, membranal o sal fundida.
- **Son reacciones fuera del equilibrio:** Las concentraciones de las especies participantes se van modificando en las cercanías de la interfase y las variaciones que tienen las mismas dependen fundamentalmente del tiempo.
- **Son unidireccionales:** El intercambio de electrones ocurre únicamente de una especie redox a otra (con la ayuda de conductores) y el flujo va del ánodo hacia el cátodo.
- **Son compartimentalizadas:** La interfase metal disolución donde ocurre la reacción debe estar alejada de la otra, con el fin de evitar interferencias; para ello se hace uso de membranas de vidrio poroso, puentes salinos, o membranas de polímeros semipermeables.

Los eventos que tienen que ver con el transporte de masa y carga son determinantes en el estudio y comprensión de las diferentes técnicas electroquímicas, puesto que de esto depende que el analito migre del seno del medio de reacción hacia el electrodo en donde tendrá lugar la reacción electroquímica.

Las reacciones electroquímicas más estudiadas son las que involucran transferencia de electrones en la interfase metal-solución generando oxidación-reducción de pares redox no necesariamente conjugados.

2.2.1 TRANSPORTE DE MASA

En lo que refiere al transporte de masa, puede haber tres regímenes bajo los cuales se puede llevar a cabo un proceso electroquímico:

- **Difusión.** Se genera un “gradiente natural”, en la cual la masa se mueve de manera espontánea de una región de mayor concentración a una menos concentrada hasta alcanzar una concentración homogénea.

- **Migración.** El movimiento de materia se da aprovechando las propiedades eléctricas de la misma, es decir aquellas especies cargadas presentes en el medio se transportarán dentro de un campo eléctrico generado como una consecuencia de la imposición de una diferencia de potencial.
- **Convección.** El transporte de la masa se da por medio físicos, mediante la agitación se genera el movimiento de la materia en toda la solución.

Los términos anteriormente mencionados quedan integrados en la ecuación de Nerst-Planck:

$$J(x,t) = -D \frac{\partial C(x,t)}{\partial x} - z \frac{zFDC}{RT} \frac{\partial \phi(x,t)}{\partial x} + C(x,y)V(x,t)$$

Donde:

$D \frac{\partial C(x,t)}{\partial x}$ Representa el transporte de materia por difusión, siendo C el gradiente de concentración a la distancia x y al tiempo t , (movimiento por difusión).

$z \frac{zFDC}{RT} \frac{\partial \phi(x,t)}{\partial x}$ Constituye el movimiento por migración debido al campo eléctrico ϕ , z y C son la carga y la concentración de la especie respectivamente.

$C(x,t)V(x,t)$ Representa el término que considera el aporte del transporte por convección donde $V(x,t)$ es la velocidad hidrodinámica en la dirección x .

Finalmente F es la constante de Faraday, R la constante de los gases ideales, T la temperatura y D el coeficiente de difusión de la especie.

Todas las aportaciones de transporte de masa son importantes a considerar, debido a que el flujo de corriente eléctrica registrada dependerá de la cantidad de materia que logre llegar al electrodo y ese movimiento estará determinado por los fenómenos previamente mencionados.

Para técnicas que requieren de regimenes de difusión como principal fenómeno de transporte de masa, se pueden realizar diferentes manipulaciones con la finalidad de reducir o controlar los aportes de trasporte de masa debido por convección (trabajando sin agitar o agitando constantemente) y migración (agregando sales iónicas concentradas).

$$i = -nFAJ; A = \text{área del electrodo. } J(x,t) = -D \frac{\partial C(x,t)}{\partial x}$$

Finalmente la corriente que se registra estará determinada por la materia que es transportada por difusión y esta corriente es proporcional al gradiente de la especie electroactiva.

$$i = nFAD \frac{\partial C(x,t)}{\partial x}$$

2.2.2 TRANSPORTE DE CARGA

El transporte de carga es el fenómeno que involucra el paso de las partículas cargadas a través de la interfase; la velocidad de transferencia de carga que tiene un proceso de oxidación y uno de reducción se describe en las siguientes ecuaciones:

$$V_{Red} = k^0 e^{\left(\frac{-\alpha nF(E-E^0)}{RT}\right)} C_{Ox}^S \quad Ec (1)$$

$$V_{Ox} = k^0 e^{\left(\frac{-(1-\alpha)nF(E-E^0)}{RT}\right)} C_{Red}^S \quad Ec (2)$$

Donde:

k^0 es constante estándar heterogénea de velocidad de transferencia de electrones.

n es el número de electrones transferidos.

T es la temperatura.

R la constante de los gases ideales.

E^0 es el potencial normal de la especie.

E es el potencial aplicado.

α es el coeficiente de transferencia de electrones.

C_{Ox}^S y C_{Red}^S son las concentraciones del oxidante y reductor respectivamente en la superficie del electrodo.

Finalmente para conocer el valor de la corriente total que es registrado por el electrodo de trabajo, es necesario el considerar el aporte de la corriente catódica y la anódica.

$$I_{TOTAL} = nFAk^0(V_{red} - V_{Ox}) \quad Ec (3)$$

De sustituir la ecuación 1 y 2 en la ecuación 3 obtenemos la ecuación de Eyring (Ec 4), la cual describe desde el punto de vista de la cinética, como es la relación entre la corriente y el potencial para una reacción donde se intercambian n electrones (Fig 2.5).

$$I_{TOTAL} = nFAk^0 \left[C_{Ox} e^{\left(\frac{\alpha nF(E-E^0)}{RT}\right)} - e^{\left(\frac{-(1-\alpha)nF(E-E^0)}{RT}\right)} C_{Red}^S \right] \quad Ec (4)$$

En condiciones de equilibrio se tiene que la velocidad de reducción es la misma que la velocidad de oxidación y al despejar de la ecuación de Eyring el potencial (E), obtendremos el potencial de equilibrio (E_{Eq}) del sistema y la ecuación se transforma en la ecuación de Nerst (Ec 5).

$$E_{Eq} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{Ox}}{C_{Red}} \quad Ec (5)$$

Para obtener la relación de que existe entre la corriente i y el potencial E en las reacciones donde se encuentran controladas por la velocidad de la transferencia de carga se despeja E^0 de la ecuación de Nerst y se sustituye en la ecuación de Eyring; a esta nueva ecuación nueva se le conoce como la ecuación de Butler-Volmer (Ec 6).

$$I = I_0 \left[e^{\left(\frac{\alpha n F}{RT} \eta\right)} - e^{\left(\frac{-(1-\alpha) n F}{RT} \eta\right)} \right] Ec (6)$$

Donde η es la sobretención que es igual a $E_{Eq} - E^0$ y el valor I^0 es el valor de la corriente de intercambio la cual se presenta cuando $E^0 = E_{Eq}$ para una señal de corriente anódica y catódica.

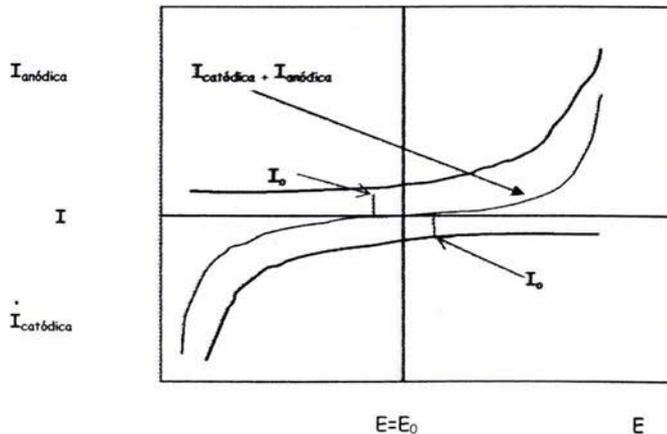


Fig 2.7 Relación desde el punto de vista cinético entre la $E-i$ para una reacción donde se intercambian n electrones. (Tomada de Baeza A, Ortiz J., "Principios de electroquímica", Documentos de Apoyo para Química Analítica Instrumental I, UNAM, México, 2004. <http://mx.geocities.com/electroquimika>).

2.2.3 GENERALIDADES DE LOS PROGRAMAS DE PERTURBACION.

Una vez que iniciamos un esquema de perturbación tanto la reacción electroquímica como los diferentes procesos de reacción ocurrirán de manera simultánea; estos procesos podrán predominar antes durante o después de la reacción dependiendo principalmente de la manera en que se mantenga el estímulo externo y del tiempo que dure, alcanzándose un nuevo estado de equilibrio al finalizar el mismo.

La magnitud de la respuesta que obtengamos de la reacción electroquímica, dependerá de la magnitud con la que ocurran los otros eventos asociados con la reacción; de la misma manera el tipo de respuesta que se obtenga, está ligado de manera muy estrecha al tipo de perturbación con la que se está trabajando; con lo que se tiene una amplia gama de técnicas para el estudio de los diferentes analitos y cada una de ellas nos proporciona información valiosa como las reacciones al electrodo que ocurren o la concentración de nuestro analito en el medio, con lo cual podemos tener una mejor caracterización del mismo.

Las técnicas electroquímicas pueden estudiarse dependiendo de cómo se realizan las mediciones:

Potenciométrica: Se trata de una técnica estática ($i=0$), donde la información que se obtiene es debida al potencial proporcionado por un electrodo indicador. Este potencial se establece en condiciones de equilibrio.

Potenciostática o potencial controlado: En esta técnica las condiciones en las que ocurre la reacción están fuera del equilibrio, es decir se basan en condiciones dinámicas, por lo que dependen del tiempo.

Para que ocurra la reacción redox se provoca una perturbación y con ella ocurre la correspondiente transferencia de electrones en el electrodo al cual se le impone el potencial. La respuesta que se obtiene debido a la transferencia de electrones se traduce en un incremento en la intensidad de corriente, la cual dependerá de la velocidad de transferencia de los electrones en la interfase metal disolución. Estas técnicas se aplican a las especies electroactivas; es decir, todas aquellas moléculas que tienen la capacidad de oxidarse y reducirse; en este caso la reacción redox no es de carácter químico sino electroquímico.

En otro aspecto a considerar dentro del estudio de las reacciones electroquímicas, es sumamente importante es el concerniente al programa de perturbación empleado experimentalmente para obtener la información que permitirá caracterizar la reacción misma. Experimentalmente se pueden hacer uso de diferentes tipos de programas de perturbación, los cuales se mencionan a continuación:

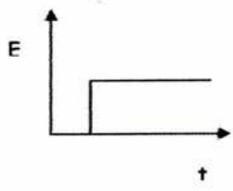
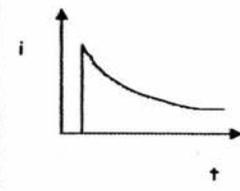
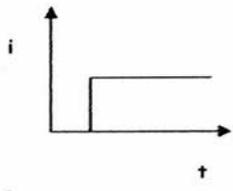
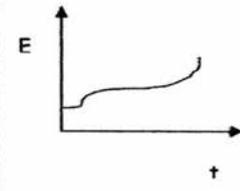
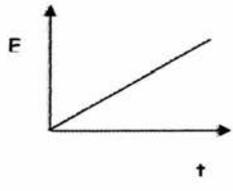
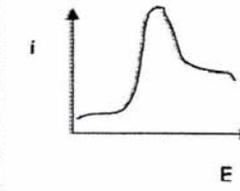
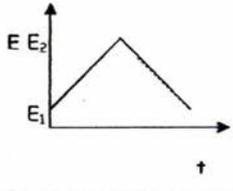
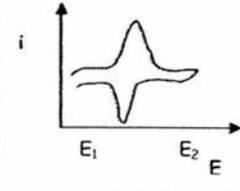
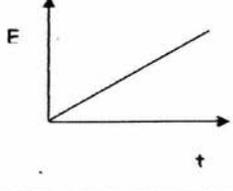
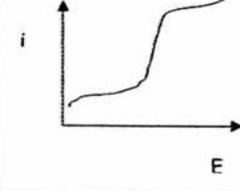
Técnica	Programa de perturbación	Respuesta
Cronoamperometría.		
Cronopotenciometría.		
Voltamperometría de barrido lineal. (Régimen de difusión pura).		
Voltamperometría cíclica o de barrido triangular. (Régimen de difusión pura).		
Voltamperometría de barrido lineal. (Régimen de difusión convectiva).		

Tabla 2.3 Diferentes diagramas de perturbación. (Tomada de Baeza A., Ortiz J., "Principios de electroquímica", Documentos de Apoyo para Química Analítica Instrumental I, UNAM, México, 2004. <http://mx.geocities.com/electroquimika>)

2.2.4 VOLTAMPEROMETRIA

La voltamperometría es una técnica electroquímica cuyo esquema de perturbación consiste en imponer una diferencia de potencial (Tabla 2.3); esta imposición de potencial, puede realizarse de dos maneras:

- i)* Voltamperometría lineal: Se modifica el potencial con respecto al tiempo (de manera lineal) y en donde el potencial de inicio, es diferente del valor del potencial con el cual concluye el “barrido de potencial”
- ii)* Voltamperometría cíclica: El potencial se va modificando de la misma manera que en el caso anterior, sólo que el potencial con el que se inicia el ensayo, es el mismo con el cual se concluye de tal manera que se cumple un ciclo y este se puede repetir tantas veces como se requiera.

En ambos casos la respuesta que se evalúa es la intensidad de corriente que se tiene como respuesta a ese potencial impuesto: Aún cuando ambas técnicas son muy semejantes, el tipo de información que proporcionan es muy diferente.

Por una parte la voltamperometría lineal, básicamente nos proporciona información relativa a la concentración de nuestro analito, mediante la relación que existe entre la corriente que se genera al electrodo en presencia de la molécula de nuestro interés. La utilidad de esta técnica, radica en la posibilidad de identificar las ondas de reducción y oxidación particulares de nuestro compuesto a monitorear y de igual forma, permite realizar la elección de un potencial de trabajo para aquellos estudios con otras técnicas que requieran de un valor de potencial fijo.

Mientras que la voltamperometría cíclica es la técnica que nos permite estudiar los mecanismos de reacción de un compuesto e incluso parámetros termodinámicos. Al usar esta técnica se puede obtener información rápida acerca del comportamiento redox de las diferentes especies, de las reacciones químicas en que participan (mecanismos de reacción, reacciones químicas acopladas), etc.

2.2.5 CRONOAMPEROMETRIA

La cronoamperometría es una técnica cuyo programa de perturbación consiste en la aplicación de una diferencia de potencial y se registra la corriente que se obtiene en función del tiempo; a diferencia de otras técnicas, la diferencia de potencial que se impone, corresponde a un valor fijo de voltaje el cual se mantiene constante durante todo el ensayo y este mismo se lleva a cabo en condiciones de difusión pura.

El cronoamperograma (curva $i-t$) refleja la disminución de la concentración del analito en las cercanías del electrodo, dicho comportamiento se describe en la ecuación de Cottrell (Ec 7).

$$i(t) = \frac{nFACD^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} = kt^{1/2}$$

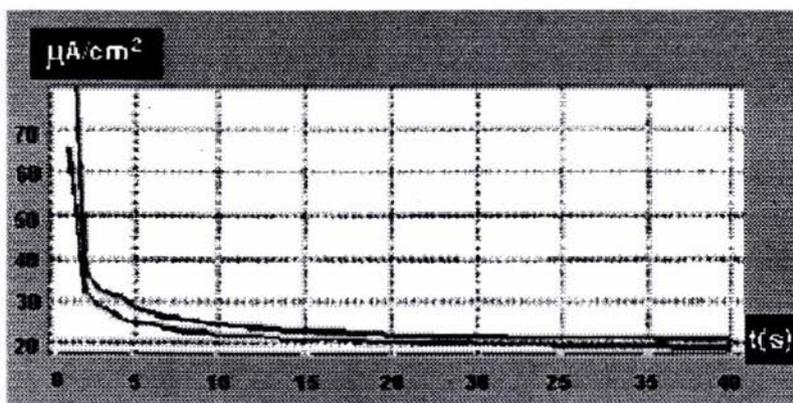


Fig. 2.8 Cronoamperograma.

2.3 MICROSISTEMAS DE DETECCION Y CUANTIFICACION DE ANALITOS.

Son múltiples las razones mediante las cuales se ha impulsado el desarrollo de equipo miniaturizado para el análisis químico, físico y biológico de diferentes tipos de muestra, las cuales pueden tener muy diversos orígenes.

El aspecto tecnológico, ecológico y económico son las principales razones por las cuales se desarrollan mas equipos miniaturizados; al reducir el tamaño de los equipos, las cantidades de muestra y reactivos requeridas para el análisis son menores, con lo que se abaten los costos asociados al estudio mismo; por otra parte también se disminuyen las cantidades de desechos que se generan, por lo cual el impacto ecológico es menor.

Ante las exigencias del trabajo de campo y de la dificultad que representa en un momento dado el trasladar una gran cantidad de instrumentos de gran volumen y costo, los cuales son requeridos para hacer determinaciones de algunas sustancias, el contar con equipos de menor tamaño representa una gran ventaja por la facilidad de transporte y las necesidades mínimas de espacio.

En otras ocasiones la cantidad de muestra de la que se dispone es tan pequeña que el realizar un ensayo en las condiciones de un equipo convencional o requiere de toda la muestra con la que se cuenta o simplemente esta es insuficiente, para lo cual un microensayo analítico es ideal.

Una de las herramientas que más se ha usado con ese fin de determinar cantidades de analitos, son los sensores y muy recientemente los biosensores: al hablar de un sensor, hablamos de un dispositivo que recibe y responde a una señal o estímulo; así un sensor electroquímico es un tipo de sensor que responde de manera específica a cambios de naturaleza eléctrica (potencial o corriente) como consecuencia de la interacción con una especie química presente en el medio ⁽³⁾.

Cuando el elemento sensor es de origen químico, ya sea orgánico o inorgánico, se habla de que es un sensor químico o ISE (Ion Selective Electrodes); este elemento sensor tiene como función el interactuar con el analito de manera específica.

Para aumentar la selectividad del sensor químico con el que se trabaja, se pueden adaptar elementos selectivos de origen biológico (enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, células, tejidos, etc).

Hoy en día es posible el realizar microensayos de casi cualquier muestra, alimentos, bebidas ⁽¹⁵⁾, muestras clínicas y biológicas ⁽⁹⁾, orgánicas ⁽¹¹⁾, inorgánicas, ^(5,6,8) con precisión y exactitud equiparables y en algunos casos incluso con valores superiores a los obtenidos con los equipos convencionales.

La variedad de técnicas de las cuales se dispone en este tipo de ensayos a microescala es amplia, se pueden realizar desde titulaciones volumétricas ácido-base, hasta polarografía e incluso ensayos tan complejos como la titulación de agua por el método de Karl-Fisher ⁽⁷⁾.

Por su versatilidad y por su amplia gama de usos, los electrodos son los instrumentos que se miniaturizan con mayor frecuencia y la variedad de tipos de estos electrodos que se pueden diseñar y adaptar o integrar a diferentes celdas nos permite contar con una amplia variedad de microsistemas de detección y cuantificación de analitos capaces de realizar mediciones "in situ" ^(1,10).

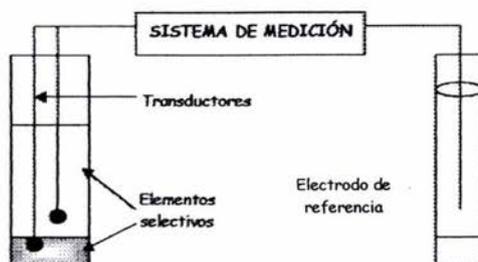


Fig. 2.9 Componentes esenciales de un ISE o biosensor. (Tomada de Baeza A., "Sensores y Biosensores", Documentos de Apoyo para Química Analítica Instrumental I, UNAM, 2004. <http://mx.geocities.com/electroquimika>)

Como se ha mencionado con anterioridad el trabajo con enzimas para emplearlos como reactivos dentro de algunas metodologías para aumentar la selectividad de la técnica sobre algún analito, se ha vuelto una práctica cotidiana, hasta un punto que hoy en día muchas técnicas con fundamentos químicos, han sido desplazadas en su uso, por aquellos ensayos en presencia de enzimas.

Los electrodos y muchos microelectrodos que se diseñan en la actualidad, están incorporando a las enzimas como componentes de selectividad del mismo electrodo para formar lo que se denomina como biosensor. Para que este microsensar funcione como biosensor, es necesario que el componente de selectividad (enzima) sea fijado sobre el transductor en un material (soporte) tal que le permita conservar su actividad biológica (Fig 2.7).

La enzima puede ser inmovilizada en el soporte de muchas maneras, y para fines del presente trabajo sólo citaremos aquellas que por su eficacia y costo resultan ser las más exitosas ⁽¹⁴⁾:

Enlaces covalentes: El soporte requiere en la mayoría de los casos de un tratamiento previo y el proceso mediante el cual se fija a la enzima implica una pérdida de la actividad de la misma; no obstante lo anterior la principal ventaja que se tiene en este procedimiento, es que la fijación al ser definitiva, la reproducibilidad entre ensayo es muy alta

Retención mediante el uso de membrana inerte: La membrana permite el paso del sustrato y de los productos de la reacción, pero a la vez impide el paso de la enzima. En este procedimiento la enzima permanece inalterada.

Adsorción: Implica el depósito en la superficie del transductor de la enzima u otro componente biológico. Su principal desventaja es la pérdida constante del elemento de selectividad de la superficie del transductor con lo que la reproducibilidad es baja.

Inmovilización dentro de una matriz polimérica: El componente biológico es ocluido dentro de la matriz del polímero, el cual puede ser inerte o tener alguna función dentro del proceso de transducción de señal

III. HIPOTESIS

HIPOTESIS

Mediante el aprovechamiento del peroxido de hidrogeno producto de la degradación enzimática de la glucosa mediada por GOD, podrán trazarse curvas de calibración de glucosa, utilizando la señal de electroxidación por voltamperometría y cronoamperometría como técnicas de detección de H_2O_2 en equipo miniaturizado de bajo costo.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO

- Diseñar, construir, caracterizar y evaluar una microcelda electroanalítica y sus electrodos para la cuantificación de glucosa.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Emplear la microcelda construida para la cuantificación de glucosa en muestras problema, como alternativa potencial para su uso en los laboratorios de química analítica de la Facultad de Química.
- Utilizar una técnica electroquímica diferente a la polarografía para realizar la cuantificación de glucosa en diferentes muestras problema.

V. MATERIAL Y METODOS

V. MATERIAL Y METODOS

5.1 REACTIVOS:

Ácido oxálico (H₂C₂O₄): Técnica química. Reactivo analítico con un porcentaje de material insoluble 0.005%, cloruros (Cl⁻) 0.002%, sulfatos (SO₄²⁻) 0.002%, calcio (Ca²⁺) 0.001% y metales pesados (como Pb) 0.005%.

Permanganato de potasio (KMnO₄): Baker analysed. Reactivo según especificaciones de la ACS; nivel de impurezas en lo que se refiere a material insoluble 0.045%, cloruro y cloratos 0.0005%, compuestos nitrogenados 0.003%, sulfatos (SO₄²⁻) 0.018%.

Peróxido de Hidrogeno (H₂O₂): Solución al 30% J.T. Baker con las siguientes especificaciones. Residuos después de la evaporación 0.0002%, cloruro (Cl⁻) < 0.2ppm, nitrato (NO₃) < 5ppm, fosfato < 0.5 ppm, sulfato (SO₄²⁻) < 0.003 y amonio (NH₄) < 2ppm.

Glucosa Oxidasa (GOD): SIGMA proveniente de *Aspergillus niger*, aproximadamente 20% proteína. Una unidad oxida 1,0 mmol de β-D-glucosa a D-gluconolactato y peróxido de hidrógeno por minuto a pH= 5,1 a 35°C. Contenido 0,22g sólido 47,500 U/g

Tris(hidroximetil)aminometano (C₄H₁₁NO₃): p.a. Merck con un 0.001% de cloruros (Cl⁻), 0.005% de sulfato (SO₄²⁻) y 0.0005% de metales pesados (como Pb).

Ácido Clorhídrico (HCl): Técnica Química con un por ciento de ácido de 36,5-38%, nivel de impurezas en el caso de metales pesados (como Pb) 0.0001% y Fe 0.0002%.

D-glucosa anhidra (CH₂ OH(CHOH)₄CHO): Técnica química reactivo analítico, rotación específica $[\alpha]_D^{25^\circ C} +52,5^\circ$ a $+53,0^\circ$, materia insoluble 0,005% perdida al secado a 105°C 0,2%, residuo de la ignición 0,02%, acidez titulable 0,002 mEq/g, cloruros(Cl⁻) 0,01% sulfatos y sulfitos como (SO₄²⁻) 0,005%, almidón (pasa la prueba), arsénico 0,00064%, metales pesados (como Pb) 0,00005%, fierro 0,00005%. Cumple con especificaciones ACS.

Agua destilada: Producción propia

5.2 MATERIAL

- 1 Frascos ámbar de 100 mL
- 3 Frascos ámbar de 10 mL
- 1 Frasco de plástico de 200 mL
- 5 Frascos de plástico de 100 mL
- 3 Tubos Falcon de 50 mL
- 2 Matraces aforados de 25 mL
- 1 Matraz aforado de 50 mL
- 4 Vasos de precipitados de 10 mL
- 1 Vaso de precipitados de 50 mL
- 4 Jeringas para insulina
- 1 Microbureta de 5mL
- 1 Pipeta volumétrica de 25mL
- 1 Pipeta graduada de 10 mL
- 4 Naves de vidrio
- 1 Espátula
- 1 Microespátula
- 1 Alambre de plata
- 1 Alambre de acero inoxidable
- 1 Punta de carbón
- Puntas de 100µL para micropipeta
- 1 Pizeta

5.3 EQUIPO

- Potenciostato/Galvanostato PGP201 Radiometer (Holanda)
- Micropolarografo de Mínima Instrumentación (MIMP).
- Potenciómetro OAKTON pH 510 series
- Microcelda electroanalítica modelo “Sputnik” (Construida en el laboratorio 3F de Química microanalítica, Facultad de Química UNAM).

5.4 METODOLOGIA

A. Preparación y titulación de permanganato de potasio (KMnO_4) 0,1 M.

1. Pesar aproximadamente con exactitud 0,79g de KMnO_4 .
2. Colocar el KMnO_4 recientemente pesado en un matraz aforado de 50 mL y agregar 15 mL de agua destilada y agitar para disolver.
3. Ya disuelta la sal llevar al aforo con agua destilada.
4. Mezclar perfectamente y trasladar a un frasco ámbar limpio y seco.
5. Tomar 1,0 mL de la disolución anterior y colocarla en un vaso de precipitados de 10 mL.
6. Agregar 1,0 mL de H_2SO_4 y agitar.
7. Agregar con microbureta poco a poco disolución de oxalato de sodio ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) 0,1 M hasta que desaparezca la coloración.
8. Registrar el valor de volumen gastado de la disolución titulante, repetir este procedimiento por triplicado y realizar tratamiento estadístico.

B. Valoración titulométrica de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) disolución estándar.

1. Tomar una alícuota de 0,5 mL de la disolución concentrada de H_2O_2 (Concentración ≈ 9.6 M), y colocarla en vaso de precipitados de 10 mL.
2. Agregar 1 mL de ácido sulfúrico 0,1M y agitar.
3. Agregar con microbureta poco a poco disolución de KMnO_4 (previamente titulada) hasta que aparezca una muy tenue coloración rosa.
4. Registrar el valor de volumen gastado de la disolución titulante, repetir este procedimiento por triplicado y realizar tratamiento estadístico.

C. Preparación de H_2O_2 0,1 M.

1. Tomar una alícuota de 0,5 mL de la disolución concentrada de H_2O_2 y transferirla a un matraz aforado de 25 mL.
2. Llevar al aforo con agua destilada.
3. Mezclar suavemente y transferir inmediatamente a un frasco ámbar y refrigerarla.

Para las siguientes metodologías, el programa de perturbación, el patrón de respuesta y el procesamiento de datos, se muestran en la siguiente figura.

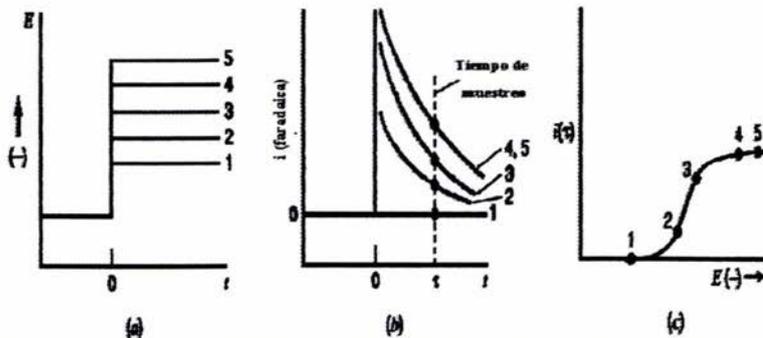


Fig 5.1 Muestreo de corriente en voltamperometría. a) secuencia de pulsos de potencial aplicadas en una serie de experimentos. b) curvas corriente-tiempo en respuesta a la secuencia de diferencias de potencial aplicadas. c) voltamperograma corriente de respuesta-potencial muestreado.

D. Prueba del Micropolarógrafo de Mínima Instrumentación (MIMP).

1. Conectar una celda ficticia al MIMP. (ver anexo 1)
2. Realizar un barrido de potencial de -500 a 500 mV de 50 en 50 mV.
3. Realizar la lectura de corriente 30 s después de haber impuesto el potencial.
4. Registrar los valores de corriente para cada uno de los puntos y construir una grafica I (μA) vs E (mV).

E. Trazado del voltamperograma control del medio de reacción.

1. Conectar la microcelda modelo "Sputnik" (ver anexo 2) al MIMP y depositar 300 μL de electrolito soporte (KNO_3 0.1).
2. Realizar un barrido de potencial de -800 a 800 mV de 50 en 50 mV.
3. Realizar la lectura de corriente 30 s después de haber impuesto el potencial.
4. Registrar los valores de corriente para cada uno de los puntos y construir una grafica I (mA) vs E (mV).

F. Construcción de la gráfica de calibración de H_2O_2 (estándar) por voltamperometría con el MIMP.

1. Conectar la microcelda modelo "Sputnik" al MIMP y depositar 300 μL de una disolución de H_2O_2 (preparada justo antes de ser usada) 0,003 M en electrolito soporte.
2. Realizar un barrido de potencial de -800 a 800 mV de 50 en 50 mV.
3. Realizar la lectura de corriente a los 30 s de haber impuesto el potencial.

4. Registrar los valores de corriente para cada uno de los puntos y construir una gráfica I (mA) vs E (mV).
5. Seleccionar un valor de potencial y registrar la corriente asociada a ese punto para construir la curva de calibración.
6. Repetir el mismo procedimiento pero ahora ensayar con disoluciones de las siguientes concentraciones: 0,006, 0,01, 0,03, 0,06 y 0,1 M.*

G. Construcción de la gráfica de calibración de H_2O_2 (estándar) por voltamperometría con el Potenciostato/Galvanostato PGP201.

1. Conectar la microcelda modelo "Sputnik" al Potenciostato/Galvanostato PGP201 y depositar 300 μ L de una disolución de H_2O_2 (preparada justo antes de ser usada) 0,01 M en electrolito soporte.
2. Realizar un barrido de potencial de -500 a 500 mV a una velocidad de barrido de 500 mV/min.
3. Seleccionar un valor de potencial y registrar la corriente asociada a ese punto para construir la curva de calibración.
4. Repetir el mismo procedimiento pero ahora ensayar con disoluciones de las siguientes concentraciones: 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09 y 0,1 M.
5. Repetir por quintuplicado este procedimiento.
6. Con los datos completos, trazar una curva de calibración ponderada para este ensayo.*

H. Construcción de la gráfica de calibración de H_2O_2 (estándar) por cronoamperometría con el Potenciostato/Galvanostato PGP201.

1. Conectar la microcelda modelo "Sputnik" al Potenciostato/Galvanostato PGP201 y depositar 300 μ L de una disolución de H_2O_2 (preparada justo antes de ser usada) 0,01 M en electrolito soporte.
2. Fijar el valor de potencial en 600 mV.
3. Establecer el tiempo de ensayo en 60 s.
4. Obtener el valor de la corriente a los 30 s del ensayo, para construir la gráfica de calibración.
5. Repetir el mismo procedimiento pero ahora ensayar con disoluciones de las siguientes concentraciones: 0,02 M, 0,03 M, 0,04 M, 0,05 M, 0,06 M, 0,07 M, 0,08 M, 0,09 M y 0,1 M.

6. Repetir por quintuplicado este procedimiento.
7. Con los datos completos, trazar la gráfica de calibración ponderada para este ensayo.*

I. Construcción de la gráfica de calibración de H₂O₂ generado "in situ" por cronoamperometría con el Potenciostato/Galvanostato PGP201.

1. Conectar la microcelda modelo "Sputnik" al Potenciostato/Galvanostato PGP201 y depositar 50 µL de una solución de GOD 10 mg/mL.
2. Fijar el valor de potencial en 600 mV y establecer el tiempo de ensayo en 60 s.
3. Agregar 300 µL de una disolución de H₂O₂ (preparada justo antes de ser usada) 0,01 M en electrolito soporte.
4. Obtener el valor de la corriente a los 30 s del ensayo, para construir la curva de calibración.
5. Repetir el mismo procedimiento pero ahora ensayar con disoluciones de H₂O₂ de las siguientes concentraciones: 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09 y 0,1 M.
6. Repetir por quintuplicado este procedimiento.
7. Con los datos completos, trazar una gráfica de calibración ponderada para este ensayo.*

***Nota: 1. La disolución de H₂O₂ 1,0 M debe prepararse el mismo día que se va a utilizar.**

2. Muy importante que durante el procedimiento experimental las disoluciones de H₂O₂ se conserven en refrigeración y el material en el que se preparen las disoluciones, así como la disolución del electrolito soporte que se usa para diluir, debe estar fría al momento de preparar cualquier disolución para la gráfica de calibración.

VI. RESULTADOS

VI. RESULTADOS

4.1 CONSTRUCCION DE LA CELDA.

El diseño final de celda empleada para realizar la serie de experimentos del presente trabajo, se presenta a continuación en la siguiente figura:

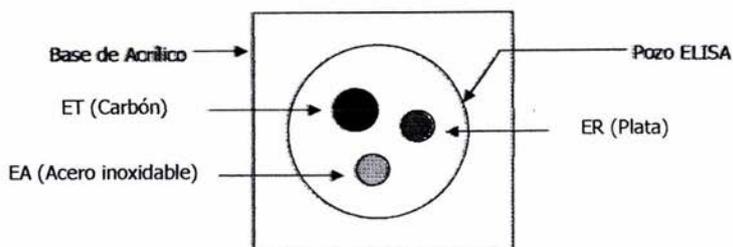


Fig. 4.1 Vista superior de la microcelda electroquímica (Modelo Sputnik).

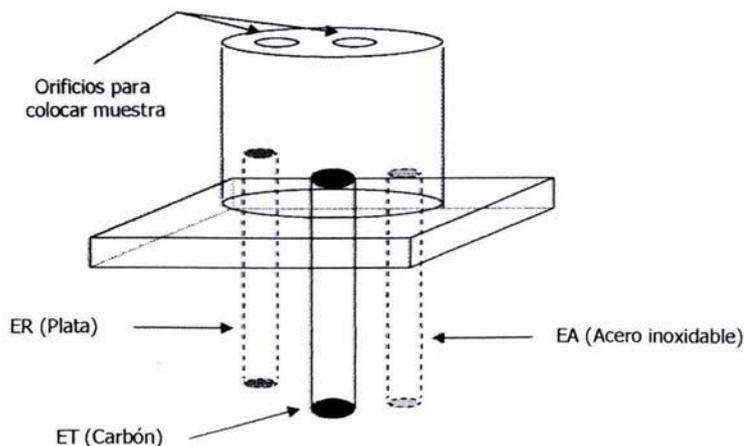


Fig. 4.2 Vista lateral de la microcelda electroquímica (Modelo Sputnik).

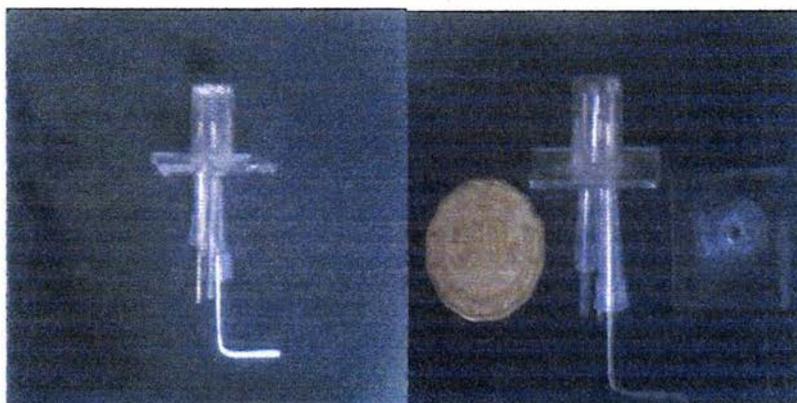


Fig 4.3 Fotografía de la micro celda "Sputnik".

Como se puede ver en los esquemas, la celda está soportada sobre una base cuadrangular de acrílico de aproximadamente 1.5 cm por lado. A esta base se le realizaron tres perforaciones, las cuales sirven para que sean insertados los diferentes electrodos que empleamos durante el monitoreo de la muestra.

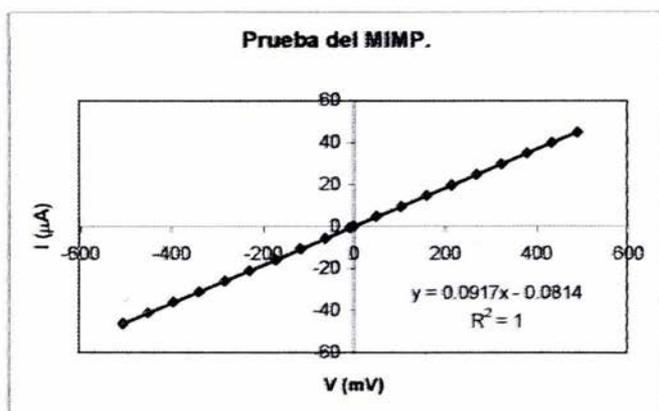
Sobre esta base es pegado el pozo de Elisa, el cual tiene dos perforaciones en la base, por las cuales puede colocarse la muestra y hacer los lavados de la misma. El volumen final de trabajo que puede contener esta celda es de 350 μ L.

4.2 ENSAYO DE PRUEBA CON UNA CELDA FICTICIA EN EL MICROPOLAROGRAFO DE MINIMA INSTRUMENTACIÓN (MIMP).

Para verificar el adecuado funcionamiento del MIMP-compacto (ver anexo 1), se hace un ensayo de prueba con el uso de una celda ficticia, en el cual evaluamos que se cumpla la ley de Ohm (Gráfica 4.1) para establecer que nuestro equipo está en buenas condiciones de operación. Los resultados de este ensayo se muestran en la tabla 4.1.

V (mV)	I (μ A)	V (mV)	I (μ A)
492	44.9	-5	-0.5
436	39.8	-60	-5.5
382	34.9	-115	-10.6
326	29.8	-170	-15.6
271	24.8	-226	-20.8
216	19.8	-280	-25.8
162	14.8	-336	-31.0
106	9.7	-392	-36.0
52	4.8	-448	-41.3
4	0.4	-503	-46.3

Tabla 4.1 Datos experimentales obtenidos del barrido de potencial con la celda ficticia usando el MIMP-compacto.



Gráfica 4.1 Gráfica de los resultados de la prueba con la celda ficticia en el MIMP-compacto.

4.3 VALORACION DE KMnO_4 CON $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 0.1 M EN MEDIO ACIDO.

Para tener resultados confiables es necesario conocer la concentración de la disolución concentrada de H_2O_2 , para lo cual es necesario valorarla.

Para valorar al peróxido de hidrogeno se necesita una disolución previamente titulada de permanganato de potasio (KMnO_4) 0.1M. Para titular dicha disolución se requiere de una disolución de oxalato de sodio ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) y el ensayo se realiza por triplicado para poder realizar el correspondiente tratamiento estadístico.

En la tabla 4.2 se muestran los resultados de dicha titulación

Tabla 4.2 Resultados de la valoración volumétrica de KMnO_4 .

Muestra	Masa $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (g)	Vol. Agr. (mL) $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$	$[\text{KMnO}_4]$ M
1	0,3335	2,61	0,1039
2	0,3332	2,60	0,1035
3	0,3233	2,69	0,1038

Promedio = 0.1037

S = 0.0002

C.V. = 0.2%

4.4 VALORACION DE H_2O_2 "ESTANDAR" CON KMnO_4 0.1 M.

Ya titulada la disolución de permanganato de potasio 0.1037 M, se realizó una valoración por triplicado (Tabla 4.3) de la disolución concentrada de peróxido de hidrogeno; pues este dato es necesario para poder preparar las disoluciones de H_2O_2 requeridas para realizar el trazado de la gráfica de calibración.

Tabla 4.3 Resultados de la valoración volumétrica de H_2O_2 .

Muestra	Vol. Agr. (mL) KMnO_4	$[\text{H}_2\text{O}_2]$ M
1	0,49	0,2450
2	0,52	0,2600
3	0,53	0,2650

Promedio = 0.2567

S = 0.0104

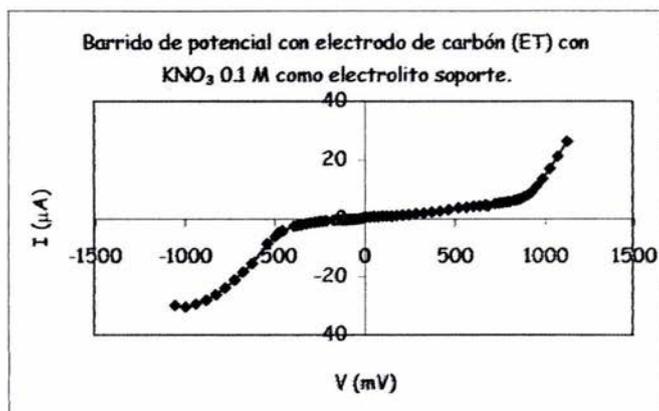
C.V. = 4.1%

Es importante el recordar que partimos de la disolución concentrada de peróxido de hidrogeno y el valor de concentración mostrado en la tabla 4.3 corresponde a la concentración de la dilución de trabajo (ver inciso B de los métodos); a continuación se muestra el cálculo realizado para establecer la concentración de la disolución concentrada de H_2O_2 .

$$[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{stock}} = (0.2567 \text{ M}) (0.025 \text{ L}) (0.0005 \text{ L})^{-1} = 12.835 \text{ M}$$

4.5 TRAZADO DE VOLTAMPEROGRAMAS CON EL MIMP.

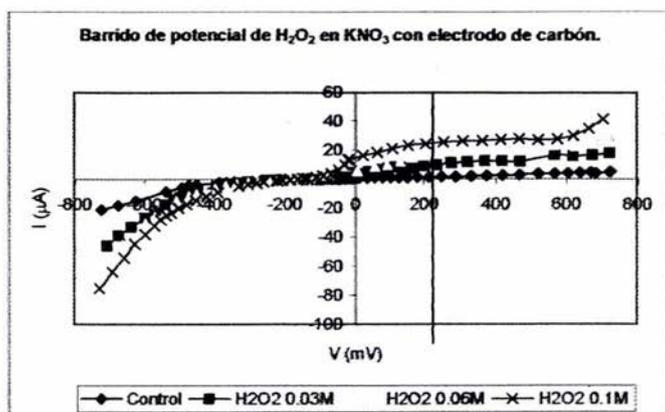
Para tener un adecuado control del sistema de medición, es necesario el trazar un voltamperograma control del medio de reacción (gráfica 4.2). Con a ayuda de esta gráfica se puede establecer cual es la onda de electrooxidación que está asociada a la presencia de H_2O_2 .



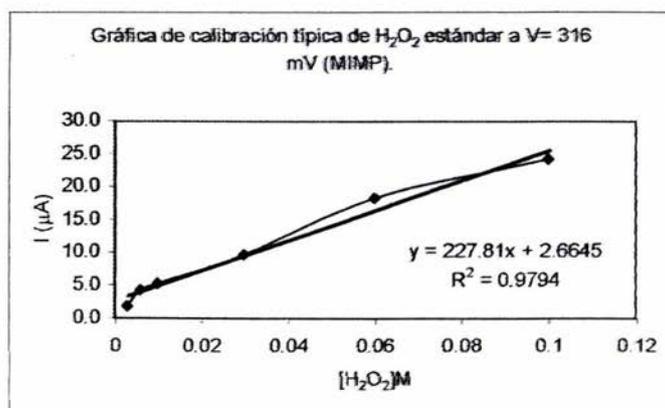
Gráfica 4.2 Barrido de potencial control del medio de reacción (KNO_3 0.1 M) con un electrodo de carbón como electrodo de trabajo (ET).

Para el trazado de la curva de calibración es necesario el fijar un potencial de lectura de corriente (Gráfica 4.3); parámetro que es indispensable para la cuantificación de peróxido de hidrogeno, dicha corriente se relaciona con la cantidad de peróxido que se encuentre en el medio.

Las diferentes corrientes registradas al potencial establecido, son graficadas contra la concentración de H_2O_2 ya sea estándar o generado *in situ* que existe en el medio (Gráfica 4.4).



Gráfica 4.3 Barridos de potencial de muestras con adiciones de H_2O_2 estándar para la construcción de una gráfica de calibración. La línea roja muestra el potencial (300 mV) al cual se registró el valor de corriente empleado en la construcción de la gráfica de calibración.



Gráfica 4.4 Gráfica de calibración de H_2O_2 en KNO_3 0.1 M construida con el MIMP.

4.6 ENSAYOS CON EL POTENCIOSTATO/GALVANOSTATO PGP201 USANDO EL PROGRAMA VOLTAMASTER 1.

Los resultados que se muestran a continuación corresponden a las pruebas realizadas con el potencióstato/galvanostato PGP201; para el monitoreo del medio se usaron los mismos electrodos que en la serie de experimentos realizados con el MIMP y las técnicas analíticas empleadas fueron voltamperometría y cronoamperometría.

Al igual que en los experimentos realizados con el MIMP es necesarios el realizar un control del medio de reacción en cada una de las series de experimentos de la curva de calibración.

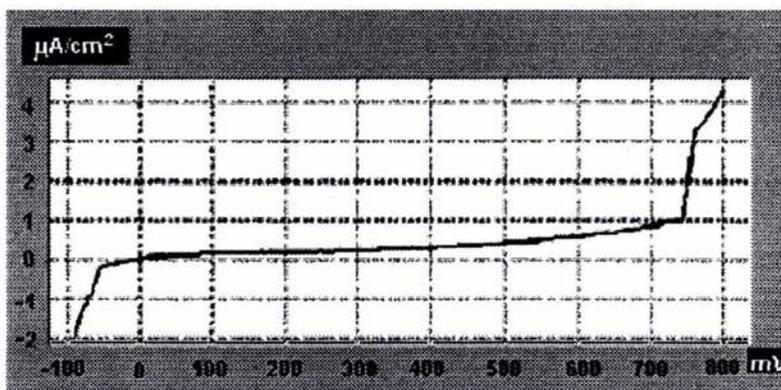


Fig 4.4 Voltamperograma control del medio de reacción (KNO_3 0.1 M como electrolito soporte).

El trazado de este control tiene dos propósitos, el primero es el de visualizar el comportamiento típico del medio de trabajo y así poder establecer cual va a ser la respuesta asociada únicamente a la presencia del analito de nuestro interés.

El segundo es el de poder hacer una corrección de los datos obtenidos para cada uno de los puntos de la gráfica de calibración, una vez que se ha obtenido el control de la serie de experimentos, mediante el registro del valor de la corriente al potencial de lectura elegido.

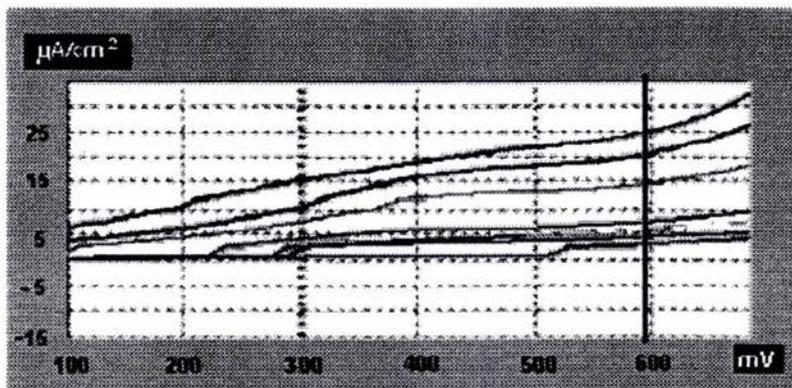
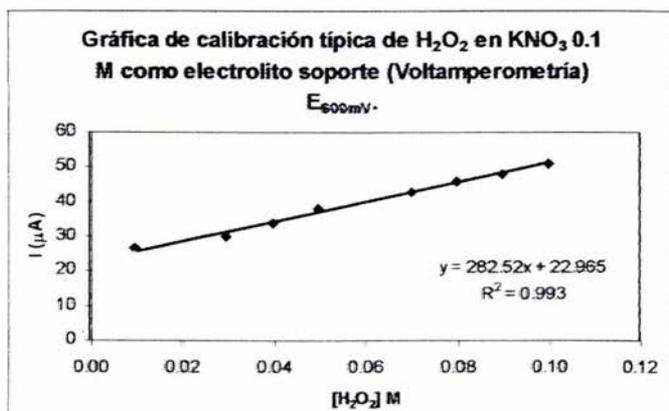


Fig 4.5 Serie de voltamperogramas empleados en la construcción de la gráfica de calibración de H_2O_2 en KNO_3 0.1 M. La línea negra, muestra el potencial de lectura al cual se registró el valor de corriente, con el que se trazó la gráfica de calibración.

De cada una de estas series de experimentos, se elige un potencial de lectura para la corriente registrada, de tal manera que pueda ser relacionada con la concentración de H_2O_2 estándar agregado en cada uno de los ensayos realizados.

En la gráfica 4.5 se muestra el trazado de una de las gráficas de calibración de H_2O_2 estándar obtenidas; para poder hacer una comparación estadística de los resultados, fue necesario el realizar dichos ensayos por quintuplicado y los resultados del procesamiento de estos datos se muestran en la Tabla 4.4.

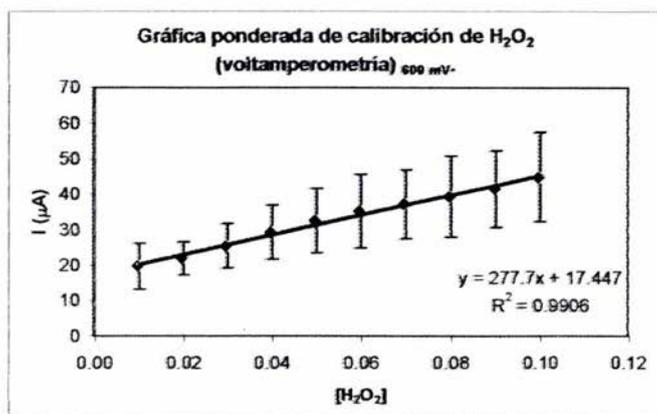


Gráfica 4.5 Gráfica típica de calibración de H_2O_2 construida por voltamperometría.

[H ₂ O ₂] M	I (μA/cm ²) Promedio	σ	CV %
0.010	19.782	6.497	32.843
0.020	21.917	4.714	21.509
0.030	25.487	6.210	24.365
0.040	29.323	7.582	25.856
0.050	32.578	8.984	27.575
0.060	35.241	10.349	29.367
0.070	37.150	9.778	26.319
0.080	39.390	11.365	28.853
0.090	41.509	10.828	26.087
0.100	44.827	12.626	28.166

Tabla 4.4 Resultados obtenidos de ponderar los datos de las distintas curvas de calibración de H₂O₂ (voltamperometría).

Para establecer la reproducibilidad entre los ensayos realizados es necesario hacer el trazado de una gráfica de calibración ponderada, en la cual se consideran todos los valores obtenidos en cada uno de los experimentos; para los experimentos correspondientes al monitoreo de peróxido de hidrógeno estándar monitoreado por voltamperometría la gráfica de calibración ponderada que se obtuvo se muestra en la Gráfica 4.6.



Gráfica 4.6 Gráfica típica de calibración ponderada de H₂O₂ construida por voltamperometría a un potencial de 600 mV.

4.7 CRONOAMPEROMETRIA APLICADA AL MONITOREO DE H₂O₂ ESTÁNDAR.

A continuación se presentan los resultados obtenidos para los ensayos realizados en la construcción de la curva de calibración de H₂O₂ estándar empleando como técnica de monitoreo a la cronoamperometría.

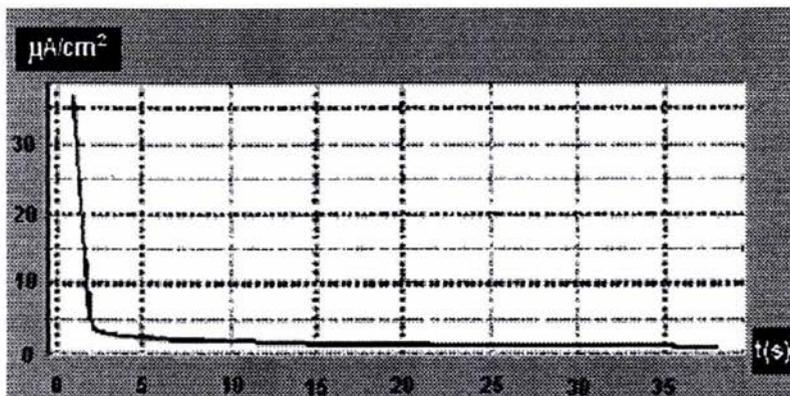


Fig 4.6 Cronoamperograma control del medio de reacción (KNO₃ 0.1 M como electrolito soporte).

Ya obtenido el control del medio, es necesario hacer un ensayo con una adición de H₂O₂ estándar y fijar el tiempo al cual se realizaran las correspondientes lecturas de corriente para cada una de las adiciones de peróxido de hidrógeno. Para elegir el tiempo de lectura, es necesario que este se encuentre en la zona del cronoamperograma en la cual el sistema muestre un comportamiento estable (Fig 4.6).

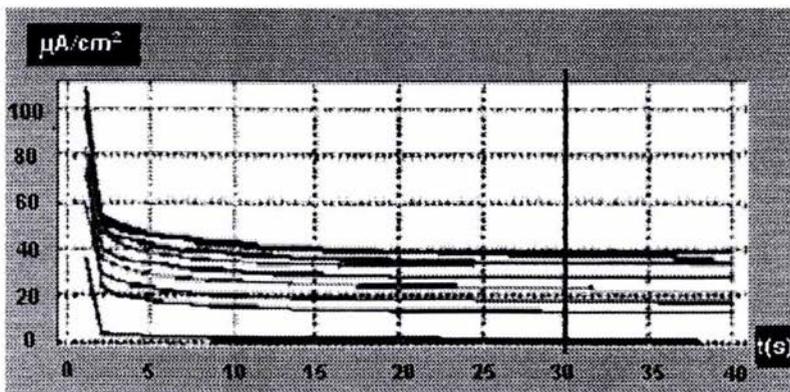
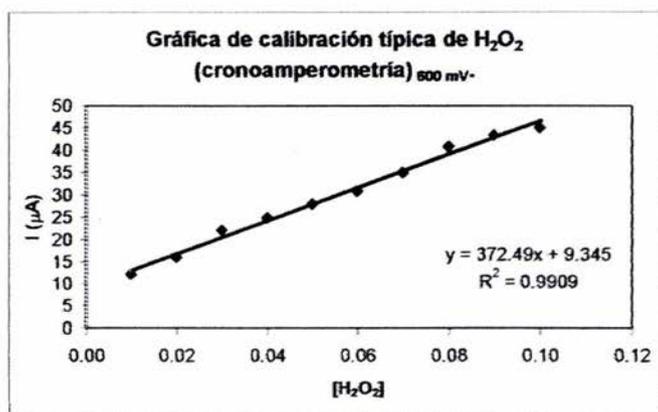


Fig 4.7 Serie de cronoamperogramas empleados en la construcción de la gráfica de calibración de H₂O₂ en KNO₃ como electrolito soporte.

Para construir adecuadamente la gráfica de calibración, es necesario que a cada punto de la curva le sea restada la corriente registrada en el cronoamperograma del control (corriente residual), para así únicamente trabajar con la corriente asociada a la presencia del analito de interés.

A continuación se muestra únicamente una de las gráficas de calibración que se obtuvieron de esta serie de experimentos, remarcando que para poder someter a tratamiento estadístico fue necesario el realizar por quintuplicado este experimento (Gráfica 4.7).

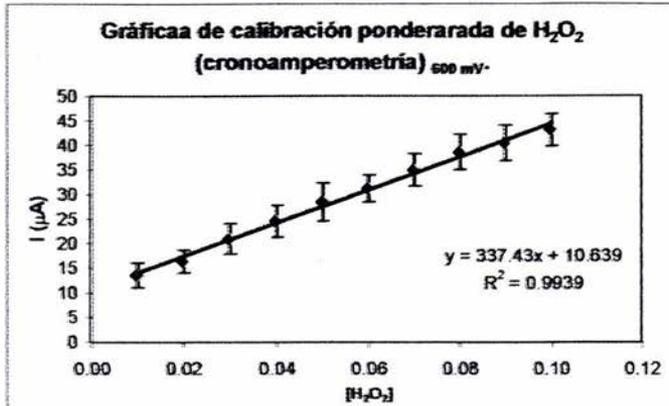


Gráfica 4.7 Gráfica típica de calibración de H₂O₂ estándar construida por cronoamperometría.

[H ₂ O ₂] M	I (µA/cm ²) Promedio	σ	CV %
0.010	13.522	2.511	18.568
0.020	16.368	2.300	14.055
0.030	20.906	3.084	14.750
0.040	24.548	3.247	13.227
0.050	28.412	3.885	13.675
0.060	31.194	2.722	8.727
0.070	34.956	3.324	9.508
0.080	38.580	3.547	9.193
0.090	40.388	3.583	8.871
0.100	43.104	3.257	7.556

Tabla 4.5 Resultados obtenidos de ponderar los datos de las distintas gráficas de calibración de H₂O₂.

Al igual que en los experimentos de voltamperometría es necesario el trazado de una gráfica de calibración ponderada, para establecer que el comportamiento del sistema es estable y que se tiene buena reproducibilidad entre ensayo. La gráfica de calibración ponderada se muestra en la Gráfica 4.7 y los datos con los cuales fue construida se encuentran en la Tabla 4.5.



Gráfica 4.7 Gráfica típica de calibración ponderada de H_2O_2 construida por cronoamperometría a un potencial de 600 mV.

4.8 MONITOREO DE H_2O_2 GENERADO *IN SITU*.

Una vez que se ha establecido que la respuesta que ofrece el sistema a las adiciones de peróxido de hidrógeno estándar es adecuada para fines de cuantificación, es necesario evaluar la capacidad que tiene el sistema para detectar el H_2O_2 que se genera *in situ* por la acción de glucosa oxidasa (GOD) sobre glucosa estándar.

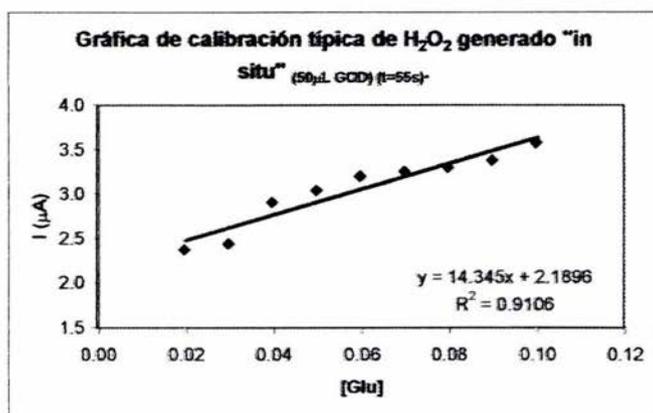
Para ello es necesario el establecer las nuevas condiciones de trabajo puesto que se presentan cambios en la composición del medio de reacción, de tal manera que se pueda realizar una adecuada cuantificación del peróxido de hidrógeno generado *in situ*.

Las condiciones óptimas de trabajo para la cuantificación del H_2O_2 generado a partir de Glucosa estándar se muestran en la Tabla 4.6.

Variable	Valor
Tiempo de lectura	55 s
GOD (10 mg/mL)	0.5 mL
[Glu]	0.02 – 0.1 M
pH	7.2

Tabla 4.6 Condiciones óptimas de trabajo para los ensayos con GOD en un volumen final de trabajo de 350 μ L y a temperatura ambiente.

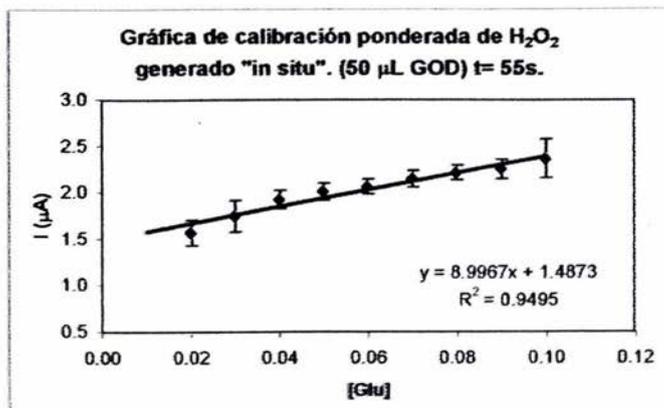
Una vez que se ha establecido las condiciones óptimas de trabajo se realiza el trazado de la gráfica de calibración y sus consiguientes repeticiones. Los resultados de esta serie de experimentos se muestran a continuación.



Gráfica 4.8 Gráfica típica de calibración de H₂O₂ generado *in situ* construida por (Cronoamperometría V= 600 mV.)

[H ₂ O ₂] M	I (μA/cm ²) Promedio	σ	CV %
0.020	1.564	0.135	8.625
0.030	1.744	0.170	9.736
0.040	1.920	0.099	5.159
0.050	2.004	0.089	4.460
0.060	2.059	0.080	3.866
0.070	2.143	0.090	4.196
0.080	2.207	0.080	3.628
0.090	2.244	0.104	4.647
0.100	2.359	0.208	8.832

Tabla 4.7 Resultados obtenidos de ponderar los datos de las distintas gráficas de calibración de H₂O₂ generado *in situ* por acción de GOD.



Gráfica 4.9 Gráfica típica de calibración ponderada de H₂O₂ generado *in situ* (Cronoamperometría V= 600 mV).

Finalmente en la tabla 4.8 se muestran los resultados obtenidos del tratamiento estadístico de los resultados obtenidos en el trazado de las curvas de calibración con cronoamperometría y voltamperometría.

Parámetro	Voltamperometría (H ₂ O ₂ estándar)	Cronoampermetría (H ₂ O ₂ estándar)	Cronoampermetría (H ₂ O ₂ generado <i>in situ</i>)
Pendiente (m)	277.7	337.43	8.9967
R ²	0.9909	0.9939	0.9495

Tabla 4.8 Valores de las pendientes (m) y coeficiente de correlación (R²) de las gráficas de calibración I_p: f(C_{H₂O₂) de H₂O₂ estándar y generado *in situ*.}

VII. ANALISIS DE RESULTADOS

7. DISCUSION DE RESULTADOS

El diseño de la celda cumple con criterios que satisfacen la necesidad de tener un equipo de fácil manejo, resistencia y fácil reparación. Las perforaciones en las que se colocan los electrodos, permiten que estos sean reemplazados en caso de falla o deterioro, o bien que sean cambiados por algún otro tipo de electrodo si esto es requerido.

Las perforaciones superiores, permiten que el colocar muestras y reactivos sea un proceso sencillo y que los lavados que necesite la celda sean rápidos, por lo cual esta celda puede ser rápidamente reutilizada.

Por el tamaño y volumen que maneja (alrededor de 300 mL) la celda es ideal en estudios electroquímicos que requieren de regímenes de difusión pura, puesto que el equilibrio se alcanza en tiempos muy cortos, lo que permite que los ensayos se realicen de forma muy rápida.

En los trazados preliminares de la curva de calibración mediante voltamperometría empleando el MIMP, establecimos que el sistema de celda y electrodos que empleamos funcionaba adecuadamente. Aun cuando el valor del coeficiente de correlación (R^2) no es muy bajo, no se decide continuar con este procedimiento pues el tiempo de ensayo es muy largo.

Estos experimentos, permitieron establecer las condiciones de trabajo necesarias para el manejo de las soluciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el intervalo de concentraciones dentro de las cuales se construiría nuestra curva de calibración, el tipo de electrodo de trabajo que usaríamos y en gran medida permitió establecer la celda a emplear para los experimentos posteriores; adicionalmente sirvió para comparar el funcionamiento del MIMP (equipo que se desarrolló en nuestro laboratorio) con el del equipo comercial (Potenciostato/Galvanostato PGP201).

En lo que respecta a los resultados obtenidos en los ensayos realizados en el potenciostato/galvanostato PGP201, particularmente en donde se empleó la voltamperometría como técnica de trabajo, se logró mejorar la correlación entre los diferentes puntos de la curva de calibración.

Esto en gran medida se debe a que el mecanismo mediante el cual el potenciostato impone y regula el potencial aplicado, es mejor que el empleado en el MIMP; adicionalmente el programa Voltmaster 1.0 registra de manera continua el valor de corriente para cada valor de potencial, mientras que en el MIMP, el registro de los valores de la intensidad de corriente se realiza de manera manual en intervalos discretos y bien definidos.

Sin embargo, aunque se logra mejorar el coeficiente de correlación en la curva de calibración de H_2O_2 estándar, la dispersión de los datos es muy alta, llegando a tener valores del coeficiente de variación (CV) por encima del 25% (Tabla 4.4); esta dispersión en los datos obtenidos tiene dos fuentes principales de error, la primera esta asociada al electrodo, ya que se observó, que con el tiempo y el uso del mismo su superficie se va deteriorando, lo que ocasiona que la reproducibilidad de los eventos sea baja; la segunda fuente de error, esta ligada a la técnica misma, ya que hay un valor de corriente residual mayor en esta técnica electroquímica y aun cuando se mejora la linealidad de la técnica la dispersión de los resultados es un parámetro que debe mejorarse.

Utilizando a la cronoamperometría como técnica de monitoreo se logra una mejora sustancial en la reproducibilidad de los experimentos, sin perder la linealidad del método, (Tabla 4.5), puesto que el valor de corriente residual asociado a cada evento se ve disminuido de manera importante. Esto se debe a que la muestra analizada está sometida desde un principio a un mismo valor de potencial y el fenómeno de transporte de carga y masa obedecen en todo momento al campo eléctrico generado como consecuencia de la imposición de una diferencia de potencial constante, lo cual se refleja en valores de CV alrededor del 10%.

Con los resultados anteriores se ha establecido que el sistema de monitoreo diseñado si es capaz de detectar al H_2O_2 que se agrega al medio, mediante la adición de alícuotas de disoluciones estándar de peróxido de hidrógeno; pero es de hacerse notar que en el momento de realizar los correspondientes experimentos en donde generamos al peróxido “*in situ*”, hay cambios importantes en la composición del medio y estas modificaciones impactan directamente en el comportamiento del sistema (Tabla 4.8).

La reducción en la magnitud del valor de la pendiente en estos experimentos, se debe principalmente a la presencia de la enzima glucosa oxidasa (GOD), pues esta se vuelve un elemento más de resistencia a la conducción de la corriente eléctrica a través de la disolución, motivo por el cual se da este abatimiento de la capacidad para detectar la respuesta a la perturbación impuesta por parte del sistema de electrodos usados.

Aún cuando la diferencia entre las pendientes es considerable, entre los experimentos donde se mide el H_2O_2 generado *“in situ”* y los que no requieren de la enzima, el comportamiento lineal del método no se ve afectado de manera importante, se nota una mejora en cuanto a la reproducibilidad en estos experimentos (Tabla 4.7), lo cual impacta directamente sobre los valores de CV que se obtuvieron para estos ensayos, los cuales están alrededor de 5%.

La diferencia entre los valores de CV para los diferentes ensayos, se debe posiblemente a la reducción de la descomposición del peróxido durante la preparación de las muestras; mientras que en los ensayos donde no se incluye a GOD como reactivo, se agregaban alícuotas de disoluciones provenientes de un “stock” de H_2O_2 ; es en este punto donde se presume que la descomposición de peróxido que ocurre durante el ensayo es mayor, debido a la manipulación de estas disoluciones de peróxido, misma que no ocurre en el otro caso, donde lo que se agrega son alícuotas de disoluciones de glucosa estándar a un medio que contiene a la enzima.

VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Como se ha comentado anteriormente, se ha logrado diseñar, construir y caracterizar una microcelda electroanalítica, dirigida a la cuantificación de glucosa mediante el empleo de la enzima GOD.

El diseño presentado cumple con características innovadoras y atractivas, tales como el tamaño, la disposición de los electrodos al interior de la celda y el hecho de estar fabricada con materiales de bajo costo (por destacar algunas), las cuales hacen de esta microcelda un instrumento potencialmente aplicable dentro de los laboratorios de enseñanza de la Facultad de Química de la UNAM.

Se ha podido utilizar esta celda para cuantificar glucosa, aprovechando al peróxido de hidrógeno (producto de la degradación enzimática de esa aldohexosa mediada por la acción de GOD), mediante el trazado de curvas de calibración.

De la misma manera se ha visto que la cronoamperometría es una técnica electroquímica que bien puede emplearse para la cuantificación de glucosa de manera rápida y sencilla, y que bien puede contemplarse como técnica alterna a la polarografía.

A futuro, se pretende continuar con este trabajo y construir más celdas para en una primera etapa emplearse en el laboratorio de Química Analítica Instrumental I; de manera alterna se pretende realizar los estudios pertinentes para estandarizar este método, aplicarlo a la cuantificación de glucosa en muestras séricas y proponerlo como una técnica de cuantificación de glucosa para su uso dentro del laboratorio clínico, para posteriormente aplicarlo dentro de los cursos prácticos de Análisis Clínicos I y II que se imparten en la Facultad de Química de la UNAM.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

IX. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA:

1. Aguilar J., *Diseño, construcción y caracterización de una microcelda electroanalítica de sensores de estado sólido, metálico y electropoliméricos*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 2003.
2. Baeza A., "Electroquímica de sistemas", *Documentos de Apoyo para Química Analítica Instrumental I*, UNAM, México, 2004. <http://mx.geocities.com/electroquimika>
3. Baeza A., "Sensores y Biosensores", *Documentos de Apoyo para Química Analítica Instrumental I*, UNAM, México, 2004. <http://mx.geocities.com/electroquimika>
4. Baeza A, Ortiz J., "Principios de electroquímica", *Documentos de Apoyo para Química Analítica Instrumental I*, UNAM, México, 2004. <http://mx.geocities.com/electroquimika>
5. Borja E., *Determinación del pH en acetonitrilo con microelectrodos miniaturizados a base de polímero conductor*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 2002.
6. Cruz N., *Diseño y construcción de prototipos de sistemas microbiosensores electroquímicos selectivos a peróxido de hidrógeno*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 2001.
7. De Santiago A., *Miniaturización, diseño y caracterización de metodologías electroanalíticas y ópticas para el área de Química Farmacéutica Biológica*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 2002.
8. Díaz P., *Construcción de un microsensor a H^+ (no membranal) para determinar potenciométricamente el pH*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 2001.
9. Díaz P., *Determinación de peróxido de hidrógeno en muestras clínicas*, Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México, 2004.
10. Espinoza V., Akhtav M., Baeza A., et al, "Effect of incubation period on phosphate sorption from three P sources in Morelos soil", *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7 ccc, 2004.
11. García G., *Construcción de un biosensor selectivo a urea con base en un transductor de POSAI*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 1997.
12. Kaplan L., Pesce A. J., *Química Clínica Técnicas de Laboratorio-Fisiopatología-Métodos de Análisis*, Editorial Panamericana, Argentina, 1992.
13. Lenhinger A., *Bioquímica Las bases moleculares de la estructura y función celular*, 2ª Ed., Ediciones Omega S.A., Barcelona, 1994.

14. Morales A., *Construcción y evaluación de biosensores amperométricos basados en biocomposites*, Tesis de Doctorado, UAB, España, 1996.
15. Muñoz M., *Diseño y caracterización de una microcelda de detección enzimática de glucosa oxidasa para la determinación de glucosa*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México 2003.
16. Lafleur R., Myland J., Oldham K., "Analytical microelectrode voltammetry with minimal instrumentation", *Electroanalysis*, Vol. 2, 1990, pp 223-228.
17. Sepúlveda J., *Encuesta Nacional de Salud 2000*, Secretaría de Salud, México 2000.
18. Velázquez M. O., Lara E. A., Tusie L. M.T.; González Ch., A. *Prevención Primaria de la Diabetes: Una Necesidad para el siglo XXI*. Biblioteca virtual INSP.
19. Voet D., *Bioquímica*, Ediciones Omega S.A., Barcelona, 1992.
20. Wild S, Roglic G., Green A., et al, "Global prevalence of diabetes", *Diabetes Care* Vol. 27 Num. 5 Mayo, 2004, pp 1047-1053.

X. ANEXOS

ANEXO 1

MIMP

En el laboratorio de Química Microanalítica de la Facultad de Química de la UNAM, se ha iniciado un proyecto de diseño, caracterización y puesta a punto de instrumentación analítica de bajo costo como alternativa docente y en investigación.

El Micropolarógrafo de Mínima Instrumentación o MIMP (del inglés *Minimal Instrumentation Micro Polarograph*), es un instrumento miniaturizado, el cual puede ser empleado en técnicas de análisis electroquímico como la voltamperometría y la polarografía.

El circuito eléctrico que emplea el MIMP es simple y fácil de reproducir (Fig A.1.1), no requiere de material costoso, por lo cual se vuelve un instrumento de fácil manufactura y muy útil en el trabajo del laboratorio de química analítica.

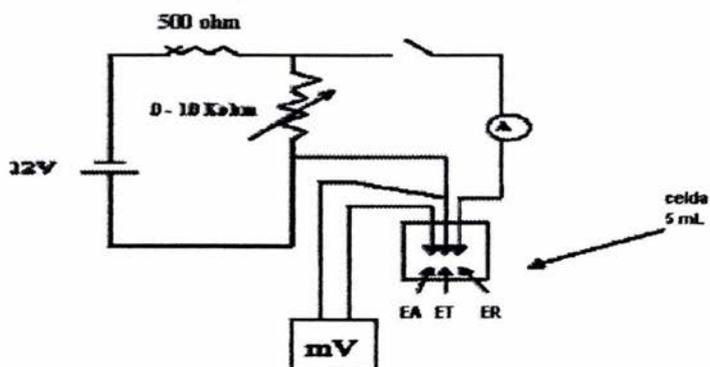


Fig A.1.1 Circuito eléctrico mejorado y adaptado con el que opera un MIMP.
ER= Electrodo de referencia ET= Electrodo de trabajo EA= Electrodo auxiliar (Adaptado de Lafleur R., Myland J., Oldham K., "Analytical microelectrode voltammetry with minimal instrumentation", *Electroanalysis*, Vol. 2, 1990, pp 223-228).

En nuestro laboratorio se han diseñado algunos de estos equipos y se puede utilizar para realizar diversos estudios. A continuación se presentan uno de los prototipos de estos MIMP.

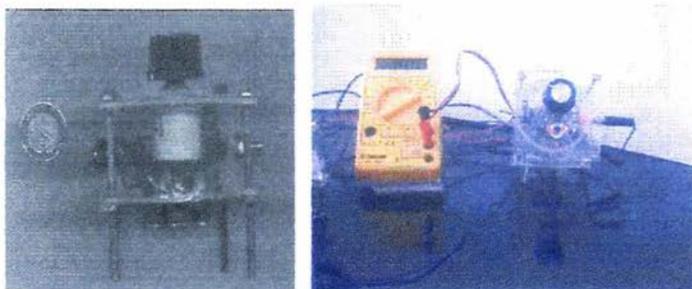


Fig A. 1.2 EL MIMP (a la derecha) puede conectarse a dos multímetros (uno para medir el E_{imp} y el otro para la i) y así se tiene un equipo completo para realizar electroanálisis.

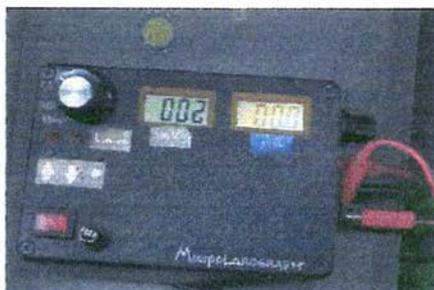


Fig A. 1.3 MIMP-compacto (diseñado por el Ing. Enrique Rangel de Diseño Servicio Consultoría para el Laboratorio DSC-ELECTRONICS@MAIL.COM, para el Laboratorio de Microelectroquímica Analítica de la Facultad de Química de la UNAM <http://mx.geocities.com/electroquimika>)

Por su tamaño puede ser fácilmente transportado y realizar análisis electroquímico en trabajo de campo, en el laboratorio de enseñanza, de investigación, etc.

ANEXO 2**Celda "Sputnik".**

Dentro del laboratorio de Microelectroquímica Analítica de la Facultad de Química de UNAM, se han desarrollado muchas celdas para el trabajo analítico, para el presente trabajo la celda "Sputnik" (Fig A.2.1) fue la celda que se empleó para desarrollar el mismo.

Esta celda consta de dos piezas, una base de acrílico y un pozo de placa Elisa (usado en el laboratorio de inmunología)



Fig A.2.1 Fotografía de la celda modelo "Sputnik" (construida en el laboratorio de Microelectroquímica Analítica de la Facultad de Química de la UNAM).

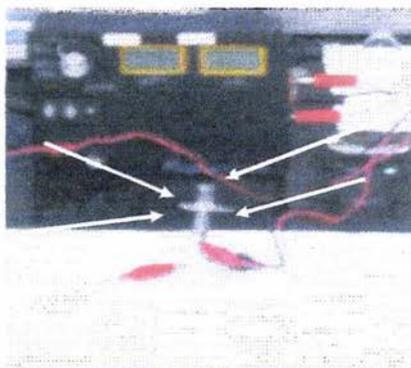


Fig A.2.2 Celda "Sputnik" conectada al MIMP-compacto.

Los electrodos son incrustados en perforaciones realizadas en la base de acrílico; mientras que en la base del pozo de ELISA se realizan perforaciones por las cuales se depositan las muestras o se lava el mismo pozo.

Los resultados obtenidos en esta celda demuestran que se cumplen las condiciones de estado estacionario como en las celdas de volúmenes convencionales.
