



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

MICROELECTRO ANÁLISIS POR ESTUDIO  
CRONOAMPEROMÉTRICO Y VOLTAMPEROMÉTRICO DEL  
SISTEMA ACOPLADO FERRICIANURO-GLUCOSA MEDIADO POR  
GLUCOSA OXIDASA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO

PRESENTA  
GUILLERMO HAZAEL ALVAREZ ARIZABALO



MEXICO D.F.

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 ASIGANDO**

**PRESIDENTE:**                   **Profesor: JOSÉ ALEJANDRO BAEZA REYES.**

**VOCAL:**                           **Profesor: JOSEFINA ELIZALDE TORRES**

**SECRETARIO:**               **Profesor: JOSÉ DE JESUS GARCIA VALDES**

**1er. SUPLENTE:**               **Profesor: ERNESTO SANCHES MENDOZA**

**2º SUPLENTE:**               **Profesor: LILIA DEL CARMEN LOPEZ SERRANO**

**Laboratorio de Electroquímica Analítica Investigación y Enseñanza Experimental.  
Edificio A. anexos de laboratorios 3-E y 3-F Facultad de Química Ciudad universitaria,  
Delegación Coyoacán, CP 04510, México D.F.**

**Asesor: Dr. José Alejandro Baeza Reyes**

---

**Sustentante: Guillermo Hazael Alvarez Arizabalo**

---

## **Agradecimientos**

**A mis padres, hermanos y familiares.**

**A mis amigos que son los hermanos que Dios me dio.**

**A mi novia por su apoyo y comprensión.**

**A mis maestros, excelentes guías que sin su ayuda esta tesis no hubiese sido posible.**

**A mi abuelita (farmacéutica también) por todo su cariño.**

**A Dios.**

---

---

## Índice

I Introducción.....	1
II Marco teórico .....	3
2.1 Glucosa .....	4
2.1.1 Importancia clínica.....	5
2.1.2 Métodos tradicionales de cuantificación.....	6
2.2 Principios de electroquímica .....	10
2.2.1 Transporte de masa. ....	14
2.2.2 Transporte de carga. ....	16
2.2.3 Generalidades de los programas de perturbación. ....	18
2.2.4 Voltamperometría. ....	21
2.2.5 Voltamperometría de barrido triangular $E=f(i)$ . ....	22
2.2.6 Cronoamperometría. ....	23
2.3 Microsistemas de detección y cuantificación de analitos.....	24
III Diseño experimental.....	28
3.1 Hipótesis .....	30
3.2 Objetivos.....	31
IV Parte experimental .....	32
4.1 Reactivos .....	33
4.2 Material .....	35
4.3 Equipos .....	35
4.4 Metodología.....	36
4.4.1 Preparación de soluciones de trabajo .....	36
4.4.2 Construcción de micro electrodos de trabajo. ....	38
4.4.3 Construcción de la microcelda. ....	39
4.5 Procedimientos experimentales .....	40
V Resultados y discusión.....	46
5.1 Cuantificación de $H_2O_2$ "estándar" con electrodos de diferentes materiales..	47
5.2 Estudio del medio de reacción .....	57
5.3 Construcción de la microcelda .....	67
5.3.1 Cuantificación de $K_4Fe(CN)_6$ 0.1 M en la microcelda .....	69
5.3.2 Cuantificación de $K_4Fe(CN)_6$ 0.01 M en la microcelda .....	71
5.4 Cuantificación de Glucosa.....	77
5.4.1 Cuantificación de Glucosa en una muestra de sangre.....	79
VI Conclusiones.....	81
VII Referencias .....	84

ADP: Adenosina difosfato.

ATP: Adenosina trifosfato.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

EA: Electrodo auxiliar.

E<sub>i</sub>: Potencial de inicio.

ER: Electrodo de referencia.

ET: Electrodo de trabajo.

E<sub>o</sub>: Potencial de inicio.

E<sub>λ</sub>: Potencial de inversión.

Glu: Glucosa

Glu-6-P: Glucosa seis fosfato.

GOD: Glucosa oxidasa.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de Hidrógeno.

HK: Hexoquinasa.

K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]: Hexacianoferrato (II) de potasio o ferrocianuro de potasio.

K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]: Hexacianoferrato (III) de potasio o ferricianuro de potasio.

LCR: Líquido cefalorraquídeo.

NADP: Forma oxidada del nicotinamida adenina dinucleótido fosfatado.

NADPH: Forma reducida del nicotinamida adenina dinucleótido fosfatado.

RNA: Ácido ribonucleico.

TRIS: Hidroximetil aminometano(C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>).

v: Velocidad de barrido.



# I. Introducción.

## ***Introducción.***

La organización mundial de la salud reporta que por lo menos 171 millones de personas en el mundo tienen diabetes y es probable que para el 2030 esta cantidad aumente a más del doble. En los países en vías de desarrollo el número de personas que la padecen aumentará un 150% en los próximos 25 años. Por lo que es importante ayudar a las personas con esta enfermedad a obtener el conocimiento y las habilidades necesarias para manejar y controlar su condición<sup>[26]</sup>.

En el mercado se encuentran equipos para la cuantificación de glucosa en sangre. El costo de una tira reactiva es de siete pesos (casi 0.5 euros). Si una persona después de comer verifica sus niveles de glucosa en sangre gastaría en tiras reactivas 45 euros al mes (tomando en cuenta tres comidas al día y un mes de 30 días) cifra que la mayoría de la población no puede pagar.

La enzima mas usada para la detección de glucosa es la glucosa oxidasa, GOD (nomenclatura enzimática). En esta reacción el sustrato es oxidado a ácido glucurónico y se produce peróxido de hidrógeno que puede ser detectado por voltamperometría y cronoamperometría usando un microelectrodo de oro, platino o carbón. El peróxido de hidrógeno oxida a el  $K_4[Fe(CN)_6]$ <sup>[15]</sup> y éste último puede ser cuantificado con mucha precisión y exactitud por métodos electroquímicos.

En el presente estudio se construyó una microcelda de bajo costo y volumen fijo (50  $\mu$ L) para cuantificar glucosa. Se plantean un sistema y diferente número de compartimentos para el electrodo auxiliar y electrodo de referencia para la cuantificación de glucosa.



## II. Marco teórico.

## II. Marco teórico.

### 2.1 Glucosa.

Los carbohidratos son cetonas o aldehídos con múltiples grupos hidroxilo<sup>[2]</sup>. Ellos constituyen la mayor parte de la materia orgánica de la tierra debido a las importantes funciones que realizan en todas las formas de vida. En primer lugar los carbohidratos sirven como almacén de energía, combustible y metabolitos intermedios. En segundo lugar, los azúcares ribosa y desoxirribosa forman parte del armazón estructural del RNA y DNA. Tercero, los polisacáridos son elementos estructurales de las paredes celulares de bacterias y plantas. De hecho la celulosa es el principal componente de las paredes de las plantas y es uno de los componentes más abundantes de la biosfera<sup>[23]</sup>.

Los monosacáridos, los carbohidratos más sencillos se denominan triosas debido a que poseen tres átomos de carbono. En la figura 1.1 se pueden apreciar los diferentes tipos de monosacáridos que existen en la naturaleza<sup>[19,23,25]</sup>.

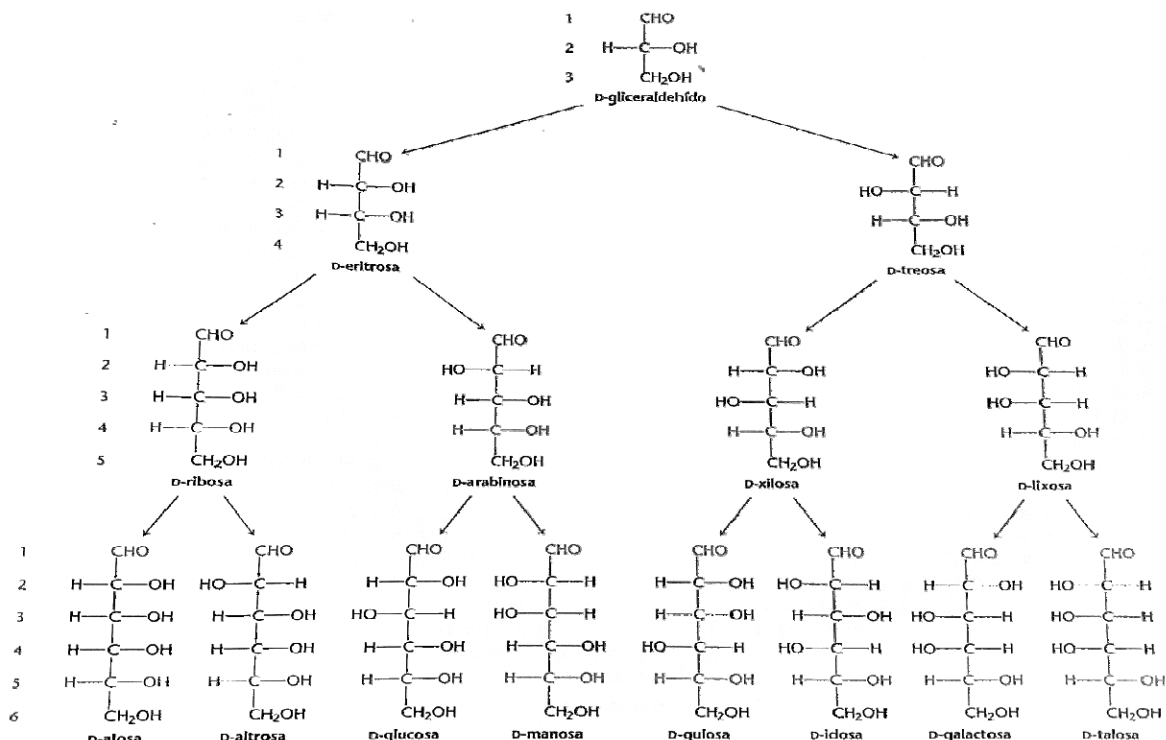


Figura 1.1 Monosacáridos de 3,4,5 y 6 átomos de carbono presentes en la naturaleza (Tomada de Stryer, Bioquímica, 5<sup>ed</sup>, editorial Reverté, S.A. Barcelona, 2003)

### ***2.1.1 Importancia clínica.***

La glucosa es uno de los compuestos que con mayor frecuencia se monitorean, a nivel prehospitario, hospitalario o posthospitalario; debido a los desequilibrios que se pueden presentar en este carbohidrato dentro del organismo están relacionados con una serie de patologías o estados patológicos<sup>[17]</sup>.

La *diabetes mellitus* es una de las principales enfermedades relacionadas con el desequilibrio en el metabolismo de la glucosa y quizá la más conocida. Se caracteriza por el aumento desproporcionado de la concentración de glucosa (hiperglicemia) por arriba de los 110mg/dL<sup>[26]</sup>. Tiene consecuencias trascendentales en la salud del individuo que la padece pues afecta diferentes órganos y sistemas deteriorando el estado de salud de 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<sup>[2]</sup>; 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. 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<sup>[17,26]</sup>.

La *diabetes mellitus* es el padecimiento más conocido en el que está implicado el 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 y reporta que en el 2005 hubo 1,1 millones de muertes debidas a la diabetes y aproximadamente un 80% de ellas se registran en países con ingresos bajos o medios.

La mitad de las muertes por diabetes ocurren en pacientes de menos de 70 años siendo el 55% mujeres. Si no se toman las medidas necesarias se reporta que para el 2030 se duplicará la cantidad de personas con esta enfermedad<sup>[26]</sup>. Por lo que es importante ayudar a las personas con diabetes a obtener el conocimiento y las habilidades necesarias para manejar y controlar su condición.

### ***2.1.2 Métodos tradicionales de cuantificación.***

Para la cuantificación de glucosa se pueden emplear: la reducción del cobre, reacción con *o*-toluidina y enzimas. Los métodos más antiguos establecidos para cuantificar glucosa en muestras sanguíneas, aprovechan la capacidad que tiene esta aldohexosa para reducir de manera directa a los iones cúpricos ( $\text{Cu}^{2+}$ ) a iones cuprosos ( $\text{Cu}^{1+}$ ); estos últimos, pueden formar óxido cuproso ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) cuando se calienta la solución en donde ocurre la reacción<sup>[17,19]</sup>.

Hay varios métodos empleados en la cuantificación de la glucosa, quizás los más 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 1.1), dicho compuesto puede ser reducido por los iones  $\text{Cu}^{1+}$ ; dicho método en un inicio se empleó debido a su alta sensibilidad, pero después se corroboró su baja especificidad y cayó 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 no 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<sup>[17]</sup>.

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 1.1) 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 para la cuantificación de glucosa, fue por su alta especificidad. Actualmente los procedimientos para determinar las cantidades de glucosa sérica que más 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<sup>[21]</sup>.

Las enzimas que se emplean con mayor frecuencia son la hexoquinasa y la glucosa oxidasa; el uso de estas enzimas aunado a la automatización dio como resultado, que las técnicas ofrecieran una mayor eficacia y selectividad<sup>[7]</sup>.

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 1.1). En este procedimiento la primera reacción no es específica pues se pueden fosforilar otras hexosas. La concentración sérica normal de estos azúcares no producen interferencias significativas por lo cual el método ha sido propuesto como procedimiento estándar para la medición de glucosa, utilizando como muestra un filtrado libre de proteínas<sup>[17]</sup>.

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 responsable de la especificidad y genera ácido glucurónico y  $H_2O_2$  (Fig 1.2). Y la segunda reacción consume el  $H_2O_2$  formando un compuesto colorido, que es determinado fotométricamente.

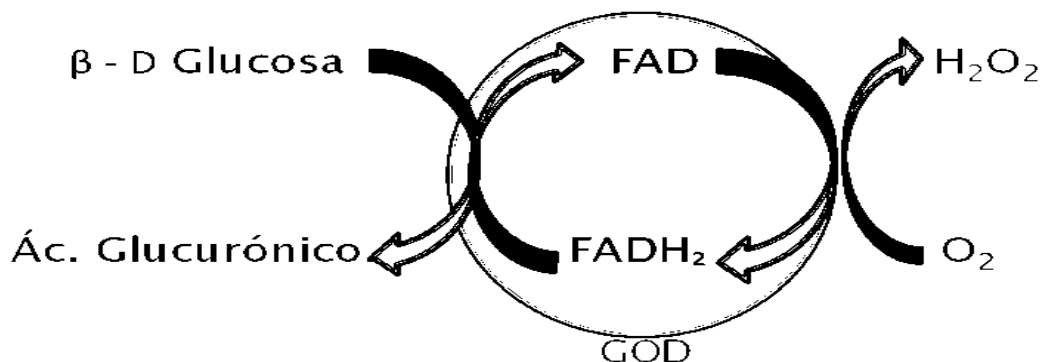


Figura 1.2 Reacción de oxidación de glucosa mediada por la enzima glucosa oxidasa (GOD).

Tabla 1.1 Diferentes métodos de análisis de glucosa que se han empleado y emplean actualmente en el laboratorio clínico.

Método	Tipo de análisis	Principio	Uso
ENZIMATICOS			
1. Hexoquinasa (HK).	Cuantitativo, aumento de Absorbancia a $\lambda=340\text{nm}$ , C o PF	$\text{Glu} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{Glu-6-P} + \text{ADP}$ $\text{Glu-6-P} + \text{NADP} \xrightarrow{\text{G-6-P.D}} \text{6-Fosfoqluconato} + \text{NADPH} + \text{H}^+$	Suero, Líquido cefaloraquídeo LCR) y orina Automatizados
2. Glucosa Oxidasa (GOD) Consumo de oxígeno (O <sub>2</sub> ).	Cuantitativo, medición polarográfica con electrodo de O <sub>2</sub>	$\text{Glu} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{Acido glucurónico} + \text{H}_2\text{O}_2$ <p>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Consumido en reacciones secundarias</p>	Suero y LCR Semiautomatizado y completamente automatizado
3. Reacción acoplada (Trinder).	Cuantitativo con diversos tipos de colorantes como aceptores finales de O <sub>2</sub> ; aumento de absorbancia; C o PF  Semicuantitativo. selección con tiras, visual o fotometría de reflexión	$\text{Glu} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{Acido glucurónico} + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Col-Red} \xrightarrow{\text{Peroxidasa}} \text{Col-Ox} + \text{H}_2\text{O}$	Suero, orina y LCR Usual y fácilmente automatizado  Suero, orina Usado en todas las selecciones con tiras
<i>o</i> -toluidina			
4. <i>o</i> -toluidina	Cuantitativo, aumento de absorbancia a 630 nm, generalmente de PF	$i\text{-toluidina} + \text{Glu} \longrightarrow \text{Glucosamina (color)}$	Suero u orina Raramente automatizado
Reducción del cobre			
5. (Neocuprina)	Cuantitativo, PF	$\text{Cu}^{2+} + \text{Glu} \xrightarrow{\text{Calor/OH}} \text{Cu}^+$	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	$\text{Cu}^{2+} + \text{Glu} \xrightarrow{\text{Calor/OH}} \text{Cu}_2\text{O}_{(s)} + \text{CuOH}$ [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	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3+} + \text{Glu} \xrightarrow{\text{Calor/OH}} \text{Fe}(\text{CN})_6^{4+}$	Raramente usado; visto a veces en sistemas Technicon de interés histórico

A= Absorbancia, C= cinético, PF = Punto final. (Tomada de Kaplan L, Pesce A. J., "Química Clínica Técnicas de Laboratorio, Métodos de Análisis", Editorial Panamericana, Argentina, 1992)

### ***2.2 Principios de electroquímica.***

La química analítica es responsable de conocer la cantidad exacta de una sustancia en una mezcla y se encarga de diseñar y establecer metodologías para la cuantificación adecuada y eficiente de analitos<sup>[3]</sup>.

Para cuantificar una molécula en particular (analito) pueden aprovecharse las propiedades fisicoquímicas de la misma como: actividad eléctrica, tamaño, propiedades ácido-base, etcétera<sup>[4]</sup>.

Un analito se puede cuantificar de forma directa o indirecta. De forma directa implica; la medición sobre el mismo. Mientras que de forma indirecta la medición se efectúa sobre:

- a) Un producto de degradación (enzimática o no enzimática).
- b) Una molécula implicada en la síntesis del analito (coenzimas o cofactores).
- c) Un producto derivado, del cual el analito sea el precursor, etcétera.

Para emplear una metodología directa o indirecta debemos tomar en cuenta las propiedades del compuesto de interés. Por ejemplo si la técnica requiere una molécula que absorba luz y nuestro analito absorbe luz, se emplea una metodología directa para la cuantificación, si no se presenta esa capacidad, se tendrá que recurrir a otra molécula que tenga dicha característica y que este relacionada con la presencia del analito<sup>[7]</sup>.

Cuando los electrones procedentes de una reacción de oxidación y reducción circulan a través de un circuito eléctrico podemos recabar información sobre la reacción, midiendo la corriente y el voltaje en el circuito<sup>[5]</sup>. La corriente eléctrica<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Corriente eléctrica: Cantidad de carga que circula por segundo a través de un circuito.



en una celda electroquímica es proporcional a la velocidad de reacción y el **voltaje**<sup>2</sup> es proporcional a la energía libre.

La electroquímica puede definirse como: “el estudio de los **procesos de reacción**<sup>3</sup> que ocurren en la interfase conductor disolución, generados espontáneamente o por medio de una perturbación externa”. Luego entonces se puede recurrir a la electroquímica para poder efectuar la cuantificación de analitos, para el estudio de mecanismos de reacción, para determinación de la concentración de especies electroactivas, diseño de nuevos métodos de cuantificación, caracterización de múltiples moléculas (de origen biológico como metabolitos, sustratos enzimáticos, o bien de origen sintético como fármacos, polímeros, entre otros)<sup>[4]</sup>.

La Figura 1.3 nos muestra cuales son los procesos que ocurren al electrodo al imponer una diferencia de potencial al equilibrio.

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<sup>[5]</sup>.

En la reacción electroquímica hay una transferencia de electrones o iones a través de interfases cargadas (metal-solución, solución-solución o membranas celulares) y cuyas características se mencionan a continuación<sup>[27]</sup>:

- **Son reacciones en sistemas heterogéneos:** Estas ocurren en la interfase metal disolución, donde la disolución puede ser acuosa, no acuosa, membranaral o sal fundida.

---

<sup>2</sup> **Voltaje:** La diferencia de potencial eléctrico entre dos puntos es una medida del trabajo necesario para hacer cuando la carga eléctrica se mueve de un punto al otro.

<sup>3</sup> **Proceso de reacción:** Conjunto de eventos que ocurren antes, durante y después de imponer una perturbación del tipo eléctrico.

- **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 compartamentalizadas:** 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<sup>[5]</sup>.

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

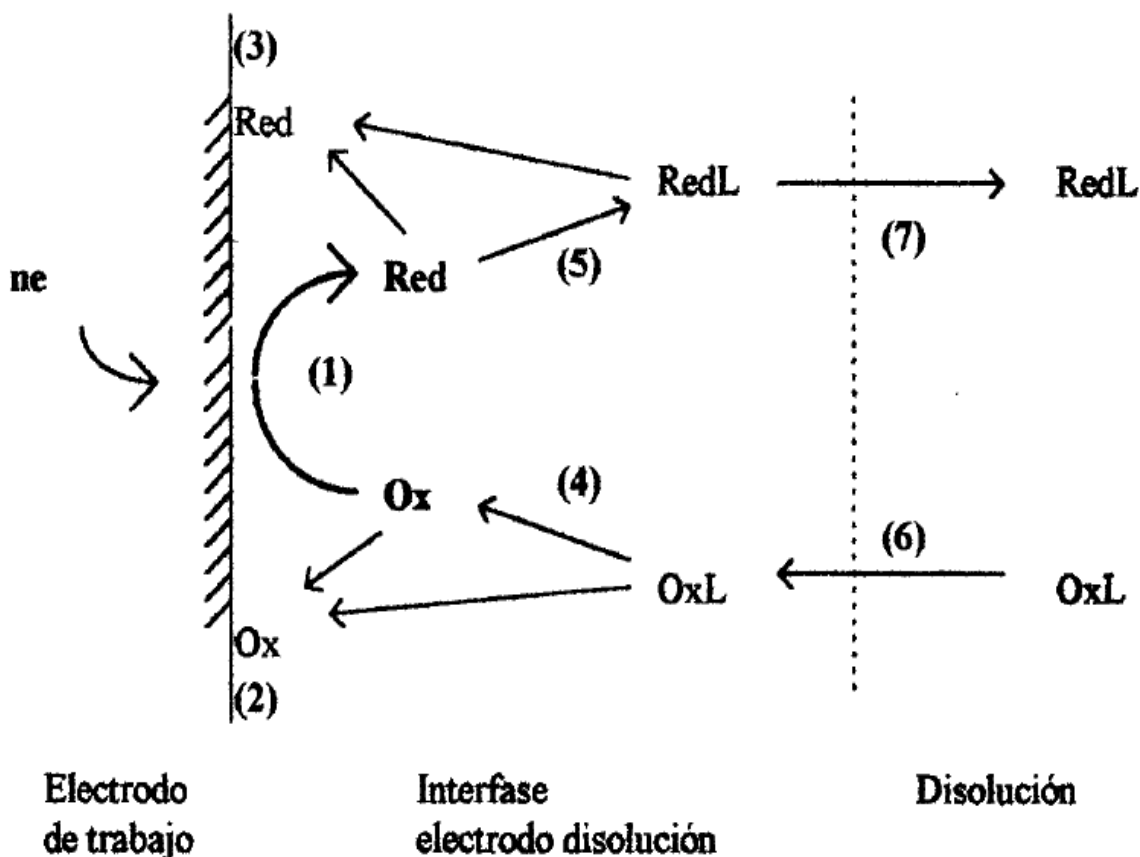


Figura 1.3 Procesos de reacción que ocurren al electrodo al imponer una diferencia de potencial diferente al potencial de equilibrio. (Tomada de Baeza A. Ortiz J., 'Principios de electroquímica', Documentos de Apoyo para Química Analítica Instrumental I, UNAM. México, 2004. <http://mx.geocities.com/electroquimika>).

- (1) Reacción electroquímica, en este caso es la reducción de Ox:  $Ox + ne^- \longrightarrow Red$
- (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.

### 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<sup>[5]</sup>:

**Difusión.** Se genera un "gradiente natural", en la cual la masa se mueve de manera espontánea de una región; de donde hay mas cantidad de materia, a donde hay menos. Esto se presenta 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 Nernst-Planck<sup>[27]</sup>:

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

Donde nos referimos a:

- $D \frac{\partial C(x,t)}{\partial x}$  : El transporte de materia por difusión.
- C: El gradiente de concentración.
- x: La distancia.
- t: El tiempo.
- $z \frac{z F D C}{RT} \frac{\partial \phi(x,t)}{\partial x}$ : Constituye el movimiento por migración debido al campo eléctrico.

- $\phi$ : El campo eléctrico
- $z$ : La carga de la especie
- $C$ : La concentración de la especie.
- $C(x, y) V(x, t)$ : Aporte del transporte por convección.
- $V(x, t)$ : La velocidad hidrodinámica en la dirección x.
- $F$ : La constante de Faraday.
- $R$ : La constante de los gases ideales.
- $T$ : La temperatura.
- $D$ : 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 regímenes de difusión como principal fenómeno de transporte de masa, se pueden realizar diferentes manipulaciones con la finalidad de reducir o controlar los aportes de movimiento de materia. Por ejemplo el movimiento de moléculas debido a la convección se puede modificar trabajando sin agitación o agitando de forma constante. Y el movimiento de partículas debido a la migración se controla agregando sales iónicas concentradas<sup>[27]</sup>.

$$i = -nFAJ \quad J(x, t) = -D \frac{\partial C(x, t)}{\partial x}$$

Donde:

$i$ : es la corriente

$A$ : área del electrodo.

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.

**2.2.2 Transporte de carga.**

El otro proceso de la reacción al electrodo incluye la etapa en la que los electrones provenientes de la reacción química pasan a través de la interfase y se llama transferencia de carga. La velocidad que tiene un proceso de oxidación y uno de reducción se describe en las siguientes ecuaciones<sup>[5,27]</sup>:

$$V_{Red} = k^0 e^{\left(\frac{-\alpha n F (E - E^0)}{RT}\right)} C_{Ox}^s \dots\dots\dots(1)$$

$$V_{Ox} = k^0 e^{\left(\frac{(1-\alpha) n F (E - E^0)}{RT}\right)} C_{Red}^s \dots\dots\dots(2)$$

Donde:

**$k^0$**  : Constante estándar heterogénea de velocidad de transferencia de electrones.

**$n$**  : El número de electrones transferidos.

**T**: La temperatura.

**K**: La constante de gases ideales.

**$E^0$** : El potencial normal de la especie.

**$E$**  : El potencial aplicado.

**$\alpha$**  : El coeficiente de transferencia de electrones.

**$C_{Red}^s, C_{Ox}^s$**  : Las concentraciones del reductor y oxidante en la superficie del electrodo.

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

$$I_{TOTAL} = nFAk^0(C_{Red}^s - C_{Ox}^s) \dots\dots\dots(3)$$

De sustituir la ecuación 1 y 2 en la ecuación 3 también conocida como la ecuación de Eyring (Ec 4) 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<sup>[5]</sup>.

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

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 ( $E$ ) y potencial de equilibrio ( $E_{Eq}$ ) del sistema esta relación matemática se transforma en la ecuación de Nernst Ec(5).

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

Para obtener la relación 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 Nernst y se sustituye en la ecuación de Eyring; a esta nueva ecuación se le conoce como la ecuación de Butler-Volmer (Ec 6).

$$I = I^0 \left[ e^{\left(\frac{\alpha nF}{RT} \eta_c\right)} - e^{\left(\frac{(1-\alpha)nF}{RT} \eta_c\right)} \right]$$

Donde:

$\eta_c$ : La sobretención que es igual a  $E_{Eq} - E^0$ .

$I^0$ : El valor de la corriente de intercambio la cual se presenta cuando  $E^0 = E_{Eq}$  para una señal de corriente anódica y catódica.

### 2.2.3 Generalidades de los programas de perturbación

Al iniciar un programa de perturbación, la reacción electroquímica y los diferentes procesos de reacción ocurren de manera simultánea; y su predominio depende de la manera en que se mantenga el estímulo externo y del tiempo que dure. Para que se lleve a cabo una reacción electroquímica debe provocarse una perturbación obtener una respuesta de donde se puede obtener información que permitirá caracterizar a la reacción electroquímica<sup>[5]</sup>.

El tipo de respuesta está asociada al tipo perturbación con la que se este trabajando; con lo que se tiene una amplia gamma de técnicas para el estudio de los diferentes analitos y cada una de ellas nos proporciona información valiosa por ejemplo: las reacciones al electrodo, la concentración del nuestro analito, mecanismo de reacción. Con la información previa podemos tener una mejor caracterización del mismo.

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

**Potenciométrica:** Se monitorean las fluctuaciones de potencial proporcionadas por un electrodo indicador. El potencial se establece en condiciones de equilibrio.

**Potenciostática o potencial controlado:** Se impone un pulso constante de potencial mediante un potenciostato y se registra la corriente obtenida en función del tiempo, manteniendo condiciones en estado estacionario (cronoamperometría). 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.

**Potenciodinámica:** Se efectúa un barrido de potencial y se monitorea la corriente (ejemplo voltamperometria  $i=f(E)$ ).



Se perturba el sistema para que ocurra la reacción redox y con esto una transferencia de electrones que a su vez se traduce en un incremento de la intensidad de corriente. La cual depende 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.

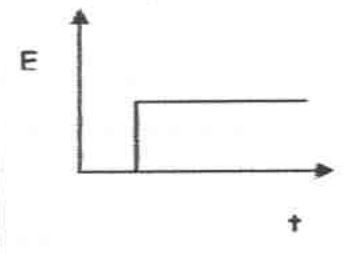
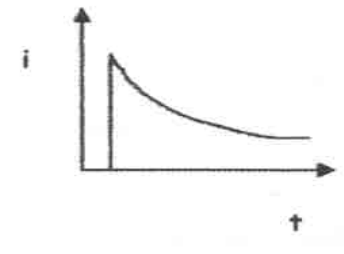
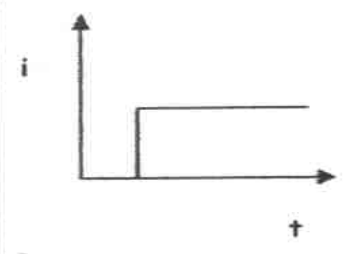
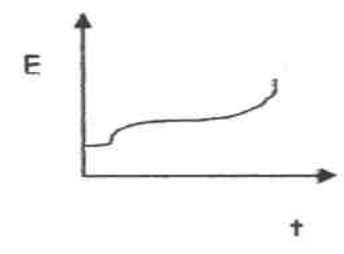
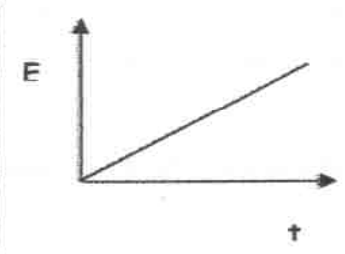
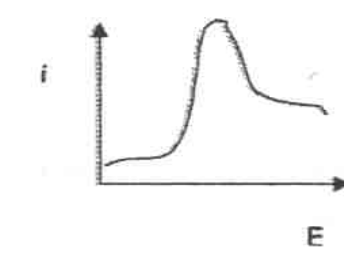
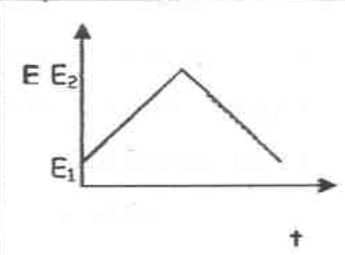
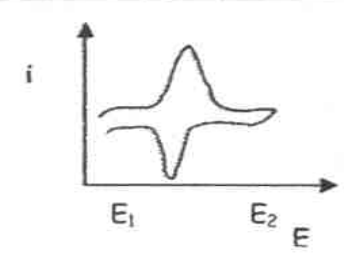
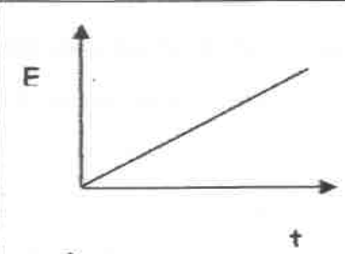
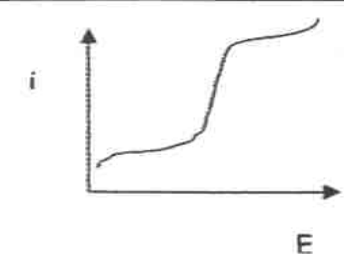
**Amperométrica:** Se cuantifica la corriente eléctrica con fines analíticos.

**Amperostática:** Se aplica una corriente constante para que se efectúe una reacción un ejemplo de esto último es la coulombimetría que se basa en la medida del número de electrones usados en una reacción química<sup>[15]</sup>. Se requiere el uso de un galvanostato para aplicar una corriente constante. Y la mayoría de los equipos en el mercado no lo poseen por lo que los métodos amperostáticos y amperodinámicos no son usados tan frecuentemente.

**Amperodinámica:** Se aplica un barrido de corriente (voltamperometría  $E=f(i)$ ).

En otro aspecto a considerar dentro del estudio de las reacciones electroquímicas, es de mucha importancia conocer el programa de perturbación empleado en el experimento para obtener la información que permitirá caracterizar la reacción. Se pueden efectuar diferentes programas de perturbación (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Diferentes diagramas de perturbación.

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).		

(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 Voltamperometría $i=f(E)$

Es una técnica electroquímica cuyo esquema de perturbación consiste en imponer una diferencia de potencial (Tabla 1.2). Y puede ser:

- a) 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".
- b) Voltamperometría cíclica (de barrido triangular de potencial): 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.

La Voltamperometría lineal 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 del mismo. La utilidad de esta técnica, radica en la posibilidad de identificar las ondas de reducción y oxidación del compuesto a monitorear y también permite identificar el potencial de trabajo para técnicas que requieran aplicar un valor de potencial fijo.

Voltamperometría cíclica es la técnica que nos permite estudiar el mecanismo 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.

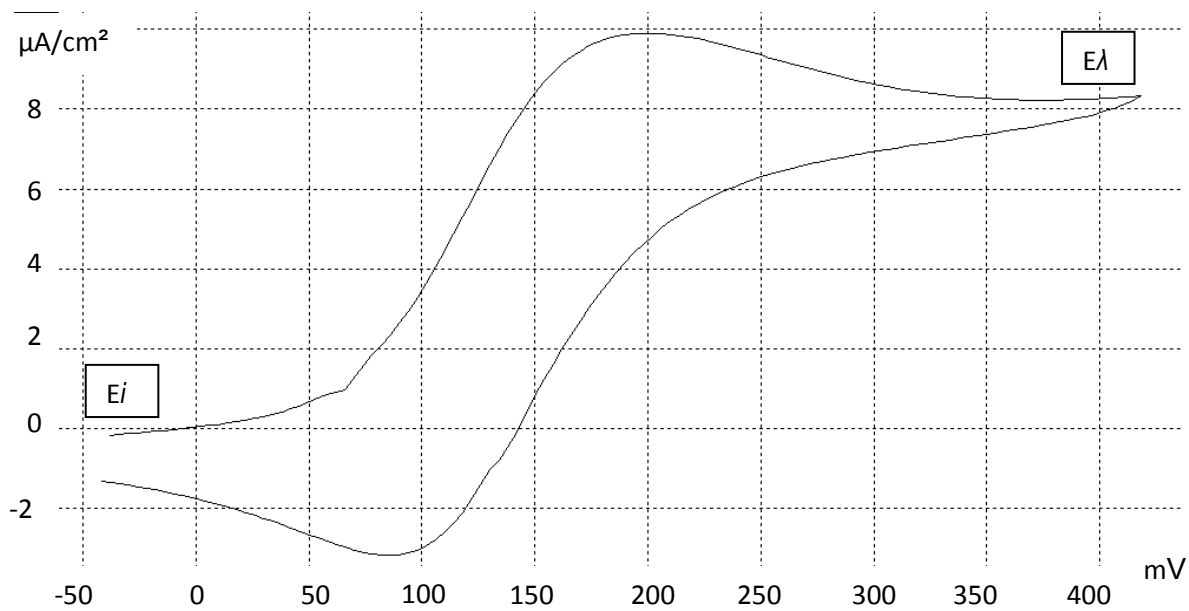


Figura 1.4 Voltamperograma típico, para una solución de  $K_4Fe(CN)_6$  0.01 M. Obtenido en una microcelda construida. Se partió de  $E_i$  -50mV y a una velocidad 400 mV/ minuto se llegó a 410 mV. Donde  $E_\lambda$  es el potencial de inversión.

### 2.2.5 Voltamperometría de barrido triangular $E=f(i)$ .

Es una técnica electroquímica cuyo esquema de perturbación (Figura 1.5) consiste en imponer una corriente y esta se modifica de forma lineal respecto al tiempo.

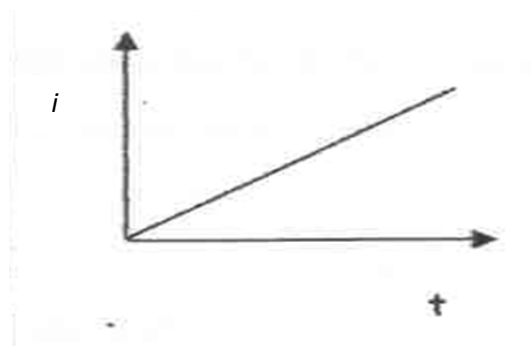


Figura 1.5, esquema del diagrama de perturbación

Cuando se efectúa un barrido de corriente se obtiene como respuesta un cambio en la diferencia de potencial, el cual cambia hacia valores de potencial característicos del par redox, la concentración de la especie varía conforme ocurre la transferencia de electrones necesaria para mantener la intensidad de corriente que cir-

cula. Una vez que la especie se acaba en las cercanías del electrodo el potencial cambia hacia valores en que otra especie pueda aportar los electrones para seguir manteniendo la corriente que circula.

El barrido de corriente nos permite: detectar concentraciones de  $5 \times 10^{-5}$  M, emplear tiempos menores para efectuar los voltamperogramas, remover con mayor facilidad las especies adheridas en la superficie del electrodo e trabajo, medir con mayor facilidad la corriente limite. Esta técnica has sido criticada por algunos autores argumentando que es difícil la construcción del equipo<sup>[14,18]</sup>.

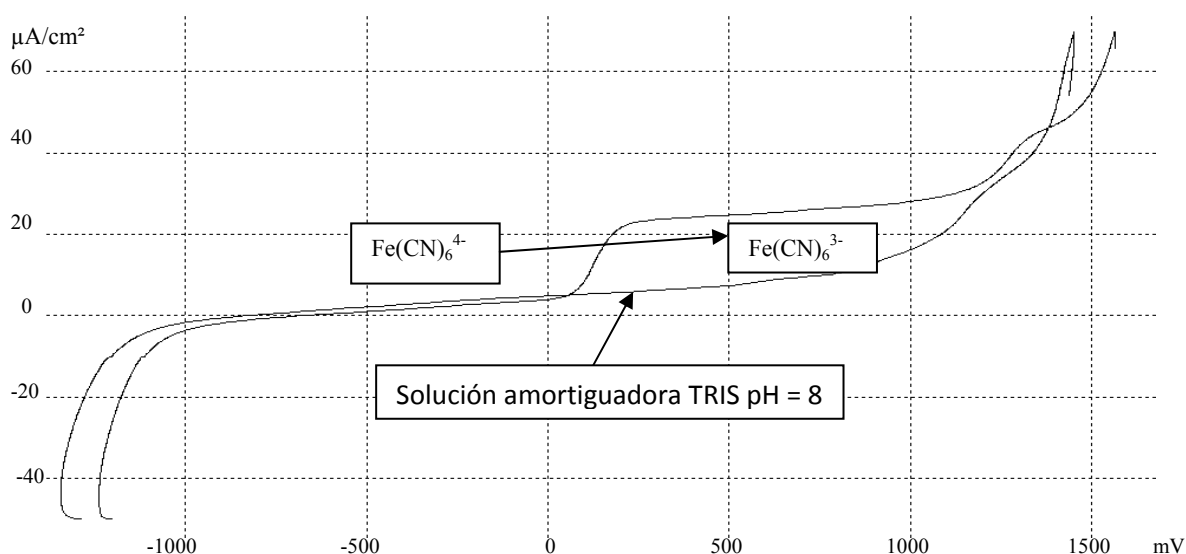


Figura 1.6 un voltamperogramas de barrido triangular de corriente  $E=f(i)$  para una solución 0.1M de  $K_4[Fe(CN)_6]$ , ET= oro, Se partió de  $-50\mu A$  y a una velocidad de 10 mA/ minuto se llegó a  $70 \mu A$ .

### 2.2.6 Cronoamperometría

La cronoamperometría es una técnica cuyo programa de perturbación consiste en la imposición de una diferencia de potencial de pulso directo mediante un potenciostato y se registra la corriente que se obtiene en función del tiempo, manteniendo las condiciones en estado estacionario.

El cronoamperograma (curva  $i-t$ ) refleja la disminución de la concentración del analito en las cercanías del electrodo, comportamiento descrito en la ecuación de Cottrell (Ec7)<sup>[27]</sup>.

$$i(t) = \frac{nFAcD}{\pi^{1/2}t^{1/2}} = kt^{-1/2} \dots\dots\dots(7)$$

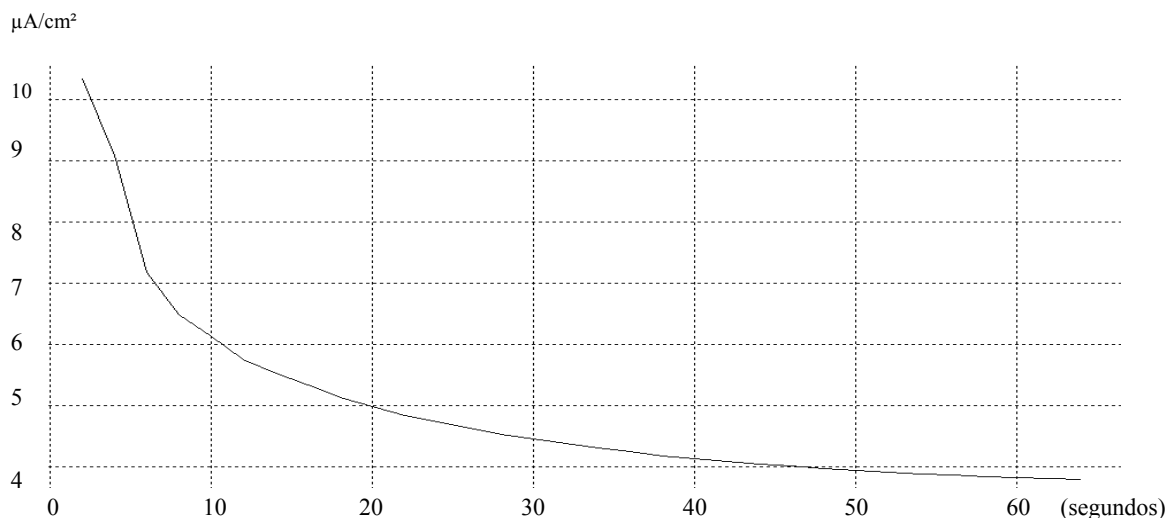


Figura 1.7, Cronoamperogramas para 50 μL de una disolución de hexacianoferrito de potasio (0.01 M). Se aplicó un pulso de potencial de 170mV durante 60 segundos.

### 2.3 *Microsistemas de detección y cuantificación de analitos.*

Existen diversos factores por los cuales se ha impulsado el desarrollo de equipo a microescala. Destacando el aspecto tecnológico, ecológico y económico. Pues al miniaturizar los equipos, se reduce la cantidades de: muestra, reactivos y desechos. Y por añadidura los costos. Equipos de menor tamaño implica una mayor facilidad de transporte y las mínimos requerimientos 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.

Un sensor electroquímico es un dispositivo 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<sup>[4]</sup>.

Cuando el elemento sensible a la respuesta es de origen químico, ya sea orgánico o inorgánico, se habla de que es un sensor químico o ISE (Ion Selectivo Electrodo); este elemento tiene como función 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, células, tejidos, etc).

En la actualidad es posible el realizar microensayos de casi cualquier muestra, alimentos, bebidas<sup>[20]</sup>, muestras biológicas<sup>[11]</sup> y muestras inorgánicas<sup>[5, 6, 8]</sup>. Se pueden efectuar determinaciones con precisión y exactitud equiparables o superiores a los obtenidos con equipos convencionales.

Las técnicas que se efectúan a microescala van desde titulaciones volumétricas ácido-base hasta polarografía e incluso ensayos tan complejos como la titulación de agua por el método Karl-Fisher<sup>[9]</sup>.

Por su amplia variedad y amplia gama de usos, los electrodos son instrumentos que se miniaturizan con mayor frecuencia. Existe una inmensa cantidad de electrodos y muchas formas de adaptarlo a una celda. Esto nos permite contar con una gran variedad de microsistemas de detección y cuantificación de analitos.

Electrodos y microelectrodos que se diseñan, están incorporando enzimas como componentes de selectividad del mismo electrodo para formar un biosensor. Para que estos últimos funcionen 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 (Figura 1.8). Para lo cual 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.

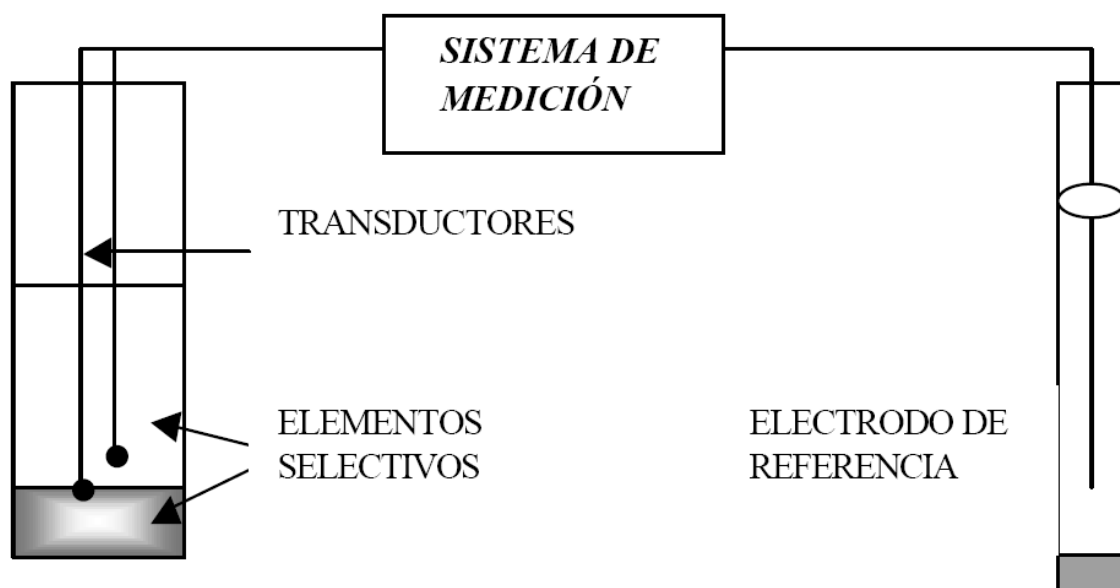


Figura 1.8 Componentes de esenciales de un ISE o biosensor. Tomada de Baeza a., "Sensores y Biosensores", Documentos de Apoyo para Química Analítica Instrumental I, UNAM, 2004 <http://mx.geocities.com/electroquimika>

Como se mencionó en el presente trabajo, el uso de enzimas como reactivos en algunas metodologías incrementan la selectividad de la técnica sobre un analito. Razón por la cual hoy en día muchas técnicas con fundamentos químicos, han sido desplazadas en su uso, por ensayos en presencia de enzimas<sup>[17,20]</sup>.

**Enlaces covalentes:** El soporte requiere en la mayoría de los casos de un tratamiento previo. El proceso mediante el cual se fija a la enzima implica una pérdida



de la actividad. Pero al estar fija (la enzima) la reproducibilidad entre ensayos es muy alta.

**Retención mediante el uso de membrana inerte:** La membrana permite el paso del substrato 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 “atrapado” dentro de la matriz de un polímero, que puede ser inerte o tener alguna función dentro del proceso de transducción de señal.

### III. Diseño experimental.

### *Diseño experimental.*

Para poder construir la microcelda primero se debe estudiar el comportamiento del medio de reacción. Para lo cual a soluciones de  $K_4[Fe(CN)_6]$  y  $K_3[Fe(CN)_6]$  (y mezclas de ambas) se adicionaron concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno (Figura 3.1). Una vez estudiado el sistema se apreció que la especie que es sensible a la oxidación debido a la presencia del peróxido de hidrógeno es el  $K_4[Fe(CN)_6]$  y con esta información se procedió a construir la microcelda para la cuantificación de glucosa.

En la presente tesis se indica como se construyó la microcelda para la cuantificación de glucosa.

Primero se estudio el comportamiento del  $K_4[Fe(CN)_6]$  en la microcelda. Acto seguido se adicionó enzima y glucosa para apreciar el comportamiento.

Se efectuaron curvas de calibración para concentraciones crecientes de  $K_4[Fe(CN)_6]$ . También se efectuaron curvas de calibración para concentraciones fijas de  $K_4[Fe(CN)_6]$  y glucosa oxidasa adicionando glucosa de forma creciente. Se analizó el coeficiente de correlación lineal de las diferentes curvas de calibración efectuadas para apreciar que porcentaje de los datos se ajustan a una línea recta.

Se empleó un número diferente de compartimentos para el electrodo auxiliar y referencia para evitar desmontar los mismos electrodos para su limpieza entre cada experimento.

### 3.1 Hipótesis.

Si se añade glucosa a una solución que contiene  $K_4[Fe(CN)_6]$  y GOD, entonces se formará peróxido de hidrógeno que oxidará el  $K_4[Fe(CN)_6]$  detectable electroquímicamente.

Si se incrementa la concentración de glucosa (a una solución que contiene  $K_4[Fe(CN)_6]$  y GOD) de forma proporcional, entonces se va a reducir la concentración de  $K_4[Fe(CN)_6]$  de manera inversamente proporcional, lo que permitirá la cuantificación de electroanalítica indirecta de la glucosa (Figura 3.1).

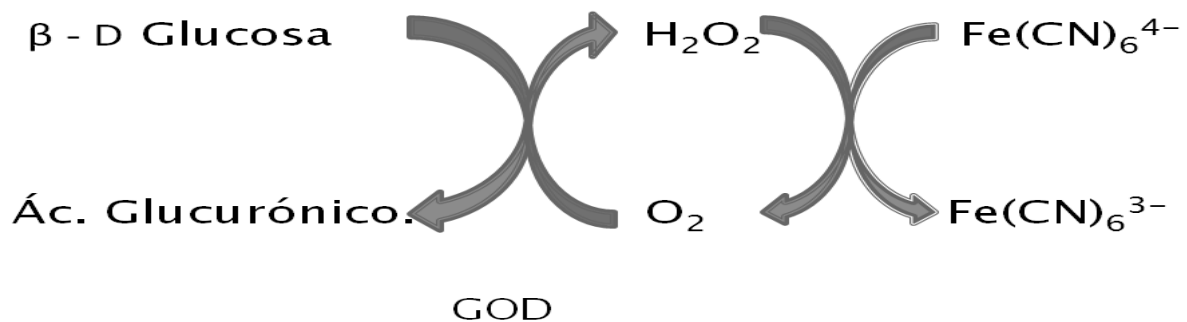


Figura 3.1, Esquema de reacción propuesto para la cunatificación de glucosa

### ***3.2 Objetivos.***

- Verificar cual es el electrodo y solución amortiguadora adecuados para cuantificar  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- Estudiar el comportamiento de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  y  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- Diseñar construir y caracterizar una celda para la detección de glucosa con elementos de bajo costo.
- Detectar la cantidad de glucosa en una muestra de sangre.

#### IV. Parte experimental.

### ***Materiales y métodos***

#### ***4.1 Reactivos***

**Fosfato monobásico de Sodio hidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ):** MERCK, para análisis con las siguientes características: cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) máximo 0.0005%, sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) máximo 0.005%, Nitrógeno (N) máximo 0.001%, Plomo máximo (Pb) 0.0005%, Fe máximo (Fe) 0.0005%, Arsénico (As) máximo (Cd) 0.00005%, Potasio máximo (K) 0.005%, pureza mínima 99%, número de lote 606169.

**Fosfato dibásico de potasio anhidro ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ):** MERCK, para análisis con las siguientes impurezas: cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) máximo 0.0005%, sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) máximo 0.003%, Nitrógeno (N) máximo 0.001%, Plomo máximo (Pb) 0.001%, Fe máximo (Fe) 0.001%, Arsénico (As) máximo (Cd) 0.000005%, sodio máximo (Na) 0.05%, pureza mínima 99%, número de lote 606129.

**Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 30%:** J. T Baker con las siguientes especificaciones. Residuos después de la evaporación 0.0002%, cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) < 0.2 ppm, nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) < 5ppm, fosfato ( $\text{PO}_4^{2-}$ ) < 0.5 ppm, sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) < 0.003% y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) < 2 ppm

**Glucosa Oxidasa (GOD):** Fluka, Glucosa oxidasa proveniente de *Aspergillus niger*, 1029 unidades /mL. Una unidad por segundo oxida 1.0 mmol de  $\beta$ -D-glucosa a ácido glucurónico y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , otras actividades amilasa < 0.2 %, catalasa < 8 %, galactosa oxidasa < 2 %, glicogenasa < 0.2, invertasa < 0.2 %. Solución amortiguadora de acetatos pH=4. Contenido neto 10 mL.

**Tris (Hidroximetil aminometano( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ )):** E. Merck para análisis con un 0.001% de cloruros ( $\text{Cl}^-$ ), 0.005% de sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) y 0.0005% de metales pesados (como Pb). Pureza mínima 99.5 %, número de lote 116983.

**Acido 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%.

**Hexaciano ferrato (II) de potasio  $K_4[Fe(CN)_6]$ :** E. Merck AG DARMSTADT, para análisis cuyas impurezas conocidas son: cloruro (Cl<sup>-</sup>) máximo 0.005%, sulfatos ( $SO_4^{2-}$ ) máximo 0.005%,  $CO_2$  máximo 0.002 %, hecho en Alemania, lote 381797.

**Hexaciano ferrato (III) de potasio  $K_3[Fe(CN)_6]$ :** E. Merck AG DARMSTADT, para análisis, hecho en Alemanas lote 381797 con las siguientes características: cloruro (Cl<sup>-</sup>) máximo 0.005%, sulfatos ( $SO_4^{2-}$ ) máximo 0.005%, Hexaciano ferrato (II) [ $Fe(CN)_6$ ] máximo 0.02%, Plomo máximo (Pb) 0.002%, Cobre máximo (Cu) 0.001% cadmio máximo (Cd) 0.001%, Sodio máximo (Na) 0.02% número de lote 25324, pureza mínima 99%.

**D-glucosa anhidra** ( $CH_2OH(CHOH)_4CHO$ ): Técnica Química S.A. calidad reactivo analítico, rotación específica  $[\alpha]_D^{25} + 52.5^\circ$  a  $+53.0^\circ$ , materia insoluble 0.005%, perdida al secado a  $105^\circ C$  0,2%, residuos de ignición 0.02%, acidez titulable 0.02 mEq/g, cloruros (Cl<sup>-</sup>) 0.01 % sulfatos ( $SO_4^{2-}$ ), >0.005%, almidón (pasa la prueba), arsénico 0,00064%, metales pesados (como Pb) 0,00005%, fierro 0.000005% Cumple con especificaciones ACS.

**Agua destilada:** Destilada en el laboratorio y de conductividad 5  $\mu S/cm$ .



### ***4.2 Material***

10 tubos de plástico con tapa de 2 mL.

10 tubos de plástico con tapa de 1 mL.

4 Jeringas para insulina.

1 Microespátula.

1 Alambre de plata.

1 Alambre de oro.

1 Alambre de acero inoxidable.

1 micropipeta automática Ependorf de 10  $\mu$ L.

1 micropipeta automática Ependorf que entregue volúmenes (10-100  $\mu$ L)

Puntas de 100  $\mu$ L, para micropipeta.

Puntas de 10  $\mu$ L, para micropipeta.

1 Pizeta.

Lancetas estériles.

Algodón.

Etanol 70 %.

### ***4.3 Equipos***

Potenciostato/Galvanostato PGP201 Radiometer (Holanda)

Potenciómetro OAKTON pH 510 series

Microcelda para la detección de glucosa (Construida en este trabajo de Tesis, en el laboratorio 3F de Química microanalítica, Facultad de Química UNAM).

Electrodo de Au<sup>0</sup> de disco rotatorio TacuSell ED | 101T

#### ***4.4 Metodología.***

##### ***4.4.1 Preparación de soluciones de trabajo.***

###### ***Preparación de la solución amortiguadora Fosfatos 0.1M pH=7.***

Tomar 0.378g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  y 0.0965g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  se llevó a 10 mL y ajustar el pH y aforar a 25 mL.

###### ***Preparación de la solución amortiguadora TRIS pH=8.***

Como electrolito soporte emplear  $\text{NaNO}_3$  1M, pesar 4.25 g de  $\text{NaNO}_3$  y 0.31768g de TRIS y disolver en 50 mL.

###### ***Preparación de $\text{H}_2\text{O}_2$ 0.1 M.***

Tomar 0.1 mL de la solución concentrada de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% y llevarla a 1 mL.

###### ***Preparación de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0.1 M.***

Pesar con exactitud 0.0844 g de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  y llevarlo a 2 mL con solución amortiguadora.

###### ***Preparación de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0.1 M.***

Pesar con exactitud 0.0658 g de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  y llevarlo a 2 mL con solución amortiguadora.

###### ***Preparación de la mezcla 0.1 M de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ y $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ .***

Pesar con exactitud 0.0844 g de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  y llevarlo a 1 mL con solución amortiguadora (solución A). Pesar con exactitud 0.0658 g de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  y llevarlo a 1 mL con la misma solución amortiguadora (solución B). Mezclar la solución A con la solución B.

### ***Preparación de $K_4[Fe(CN)_6]$ 0.01 M.***

Si la exactitud de su balanza se lo permite pese 0.0084g de  $K_4[Fe(CN)_6]$  y llévelo a 2 mL.

Si no prepare la solución 0.1M y diluir 1 a 10.

### ***Preparación de Glucosa.***

Para preparar las concentraciones (70-120 mg/dL) de glucosa vea la siguiente tabla (4.1).

Tabla 4.1 cantidad de glucosa y volumen de solución amortiguadora necesarias para construir la curva patrón.

Cantidad de glucosa* g	mL de Solución amortiguadora de fosfatos	Concentración final mg/dL
0.0014	2	70
0.0016	2	80
0.0018	2	90
0.0010	1	100
0.0011	1	110
0.0012	1	120

\* Si su balanza no le permite pesar esa cantidad pese 10 veces mas y diluya 1 a 10 con solución amortiguadora de fosfatos pH=7

#### ***4.4.2 Construcción de microelectrodos.***

##### ***Microelectrodos de referencia y auxiliar para la cuantificación de $H_2O_2$ estándar.***

El electrodo de referencia es un alambre de plata que previamente se pulió y se introdujo en un tubo capilar con un algodón en un extremo y en el otro se selló con parafilm. Y como electrodo auxiliar se empleó un segmento de acero inoxidable de alta pureza previamente pulido.

##### ***Microelectrodo de Trabajo para la microcelda.***

Para construir el electrodo de trabajo:

1. Cortar un pedazo de alambre de oro de 1 mm de diámetro.
2. Sellar con cinta teflón.
3. Pulir la superficie con alúmina de 50  $\mu\text{m}$ .

##### ***Microelectrodo de referencia para la microcelda.***

Para la elaboración del microelectrodo de referencia: se debe recubrir un alambre de plata con cloruro de plata mediante el siguiente procedimiento.

1. Pulir el alambre de plata.
2. Conectar el alambre al polo positivo de una pila de 12 V.
3. Colocar gran parte del alambre en una solución de HCl 0.1 M.
4. Cerrar el circuito eléctrico introduciendo un alambre de acero inoxidable de alta pureza conectando al polo negativo de la pila.
5. Después de 25 segundos sacar el alambre de plata recubierto con AgCl.
6. Introducir el alambre dentro de una punta de micropipeta con  $\text{NaNO}_3$  0.1 M y un extremo tapado con un algodón.
7. Sellar el otro extremo de la punta de micropipeta con cinta teflón.

**Microelectrodo auxiliar para la microcelda.**

Para elaborar el electrodo auxiliar:

1. Cortar un pedazo de acero inoxidable.
2. Pulir la superficie con el microtaladro.

**Elaboración de los diferentes compartimentos.**

Para Construir los diferentes compartimentos:

1. Cerrar un extremo la punta de una micropipeta con algodón.
2. Llenar la punta de la micropipeta con  $\text{NaNO}_3$  0.1 M.
3. Introducir el microelectrodo y cerrarlo a presión.

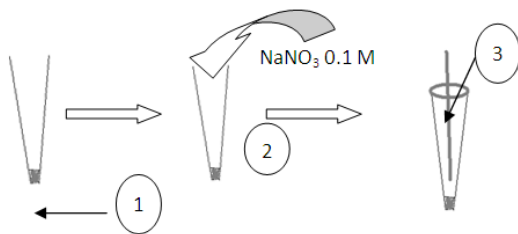


Figura 4.1 Diagrama de cómo construir un compartimento

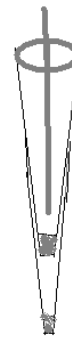


Figura 4.2 Esquema de dos compartimentos

**4.4.3 Construcción de la microcelda.**

Para formar el pocillo se desgastó con una punta cilíndrica del microtaladro un pedazo de acrílico de  $1 \text{ cm}^2$  de área, acto seguido se efectuaron tres perforaciones de 1.8 mm con la microbroca.

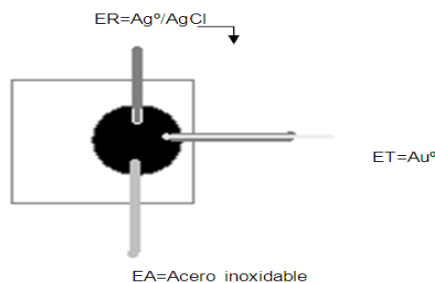


Figura 4.3 diagrama de la microcelda empleada para la cuantificación de glucosa donde ER= electrodo de referencia, ET= Electrodo de trabajo y EA= Electrodo Auxiliar

#### ***4.5 Procedimientos experimentales.***

##### ***A) Elaboración de la curva de calibración de $H_2O_2$ estándar por voltamperometría cíclica con electrodos en forma de disco de diferentes materiales.***

1. Ensamblar al electrodo de disco rotatorio Tacusell el electrodo de oro.
2. Pulir el electrodo con Alumina de  $0.05\mu\text{m}$ .
3. Adicionar la celda de vidrio 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos.
4. Introducir los microelectrodos de referencia y auxiliar.
5. Conectar los electrodos.
- 6 . Efectuar un barrido de  $-200\text{ mV}$  a  $1100\text{ mV}$  con una velocidad de  $500\text{ mV/seg}$ .
7. Adicionar  $100\ \mu\text{L}$  de  $H_2O_2$   $0.1\text{ M}$ .
8. limpiar la superficie del electrodo de trabajo con un pañuelo desechable.
9. Efectuar un barrido de  $-200\text{ mV}$  a  $1100\text{ mV}$  con una velocidad de  $500\text{ mV/seg}$ .
10. Repetir (7,8 y 9) hasta haber adicionado  $1\text{ mL}$  de  $H_2O_2$   $0.1\text{ M}$
11. Repetir el mismo procedimiento, pero ahora emplear el electrodo de platino en forma de disco.
12. Repetir 1 a 9 empleando como electrodo de trabajo carbón vítreo en forma de disco.

***B) Estudio del comportamiento de  $K_4[Fe(CN)_6]$  y  $K_3[Fe(CN)_6]$  y mezclas de los mismos presencia de  $H_2O_2$  mediante barridos triangulares de corriente  $E=f(i)$ .***

1. Ensamblar al electrodo de disco rotatorio Tacusell el electrodo de oro.
2. Pulir el electrodo de oro con Alumina de  $0.05\mu\text{m}$ .
3. Adicionar la celda de vidrio 1 mL de solución 0.1 M de la mezcla de  $K_4[Fe(CN)_6]$  y  $K_3[Fe(CN)_6]$ .
4. Introducir los microelectrodos de referencia y auxiliar.
5. Conectar los electrodos al equipo.
6. Efectuar un barrido de  $-50\ \mu\text{A}$  a  $70\ \mu\text{A}$  con una velocidad de  $10\ \mu\text{A}/\text{minuto}$ .
7. Adicionar  $100\ \mu\text{L}$  de  $H_2O_2$  0.1 M
8. limpiar la superficie del electrodo de trabajo con un pañuelo desechable.
9. Efectuar un barrido de  $-50\ \mu\text{A}$  a  $70\ \mu\text{A}$  con una velocidad de  $10\ \mu\text{A}/\text{minuto}$ .
  
10. Repetir (7-9) hasta haber adicionado 1mL de  $H_2O_2$  0.1 M
  
11. Repetir el mismo procedimiento, pero ahora emplear la solución 0.1 M de  $K_4[Fe(CN)_6]$ .
  
12. Para la solución 0.1 M de  $K_3[Fe(CN)_6]$ , repetir( 1 a 9) pero comenzar el barrido (6 y 9) en  $70\ \mu\text{A}$  a  $-50\ \mu\text{A}$  con una velocidad de  $10\ \mu\text{A}/\text{minuto}$ .

### ***C) Obtención de la curva de calibración de $K_4[Fe(CN)_6]$ 0.1 M en la microcelda por voltamperometría cíclica.***

1. Limpiar el electrodo de oro
2. Ensamblar los tres electrodos a la microcelda.
3. Adicionar a la microcelda 50  $\mu$ L de solución amortiguadora de fosfatos pH=7.
4. Conectar los electrodos al equipo.
5. Efectuar un barrido de -250 mV a 410 mV con una velocidad de 300 mV/minuto.
6. Limpiar la microcelda y secarla un pañuelo desechable.
7. Limpiar la superficie del electrodo de trabajo.
8. Adicionar 50  $\mu$ L de  $K_4Fe(CN)_6$  0.1 M.
9. Efectuar un barrido de -250 mV a 410 mV con una velocidad de 300 mV/minuto.
10. Repetir (6, 7, 8 y 9) con todas las diluciones de  $K_4Fe(CN)_6$  0.1 M.

### ***D) Obtención de la curva de calibración de $K_4[Fe(CN)_6]$ 0.01 M en la microcelda mediante voltamperometría cíclica.***

1. Ensamblar los tres electrodos a la microcelda.
2. Limpiar el electrodo de oro.
3. Adicionar a la microcelda 50  $\mu$ L de solución amortiguadora de fosfatos pH=7.
4. Conectar los electrodos al equipo.
5. Efectuar un barrido de -50 mV a 410 mV con una velocidad de 400 mV/minuto.
6. Limpiar la microcelda y secarla un pañuelo desechable.
7. Limpiar la superficie del electrodo de trabajo.
8. Adicionar 50  $\mu$ L de  $K_4[Fe(CN)_6]$  0.01 M.
9. Efectuar un barrido de -50 mV a 410 mV con una velocidad de 400 mV/minuto.
10. Repetir (6, 7, 8 y 9) con todas las diluciones de  $K_4[Fe(CN)_6]$  0.01 M.



### ***E) Obtención de la curva de calibración de $K_4[Fe(CN)_6]$ 0.01 M en la microcelda mediante cronoamperometría.***

1. Ensamblar los tres electrodos a la microcelda.
2. Limpiar el electrodo de oro.
3. Adicionar a la microcelda 50  $\mu$ L de solución amortiguadora de fosfatos pH=7.0.
4. Conectar los electrodos al equipo.
5. Fijar un potencial de 170 mV durante 1 minuto.
6. Limpiar la microcelda y secarla un pañuelo desechable.
- 7 Limpiar la superficie del electrodo de trabajo.
8. Adicionar 50  $\mu$ L de  $K_4[Fe(CN)_6]$  0.01 M.
9. Fijar un potencial de 170 mV durante 1 minuto.
  
10. Repetir (6, 7, 8 y 9) con todas las diluciones de  $K_4[Fe(CN)_6]$  0.01 M.

### ***F) Cuantificación de Glucosa en la microcelda mediante voltamperometría cíclica.***

1. Ensamblar los tres electrodos a la microcelda.
2. Limpiar el electrodo de oro.
3. Adicionar a la microcelda 50  $\mu$ L de solución amortiguadora de fosfatos pH=7.0.
4. Conectar los electrodos al equipo.
5. Efectuar un barrido de -50 mV a 410 mV con una velocidad de 400 mV/minuto.
6. Limpiar la microcelda y secarla un pañuelo desechable.
7. Limpiar la superficie del electrodo de oro.
8. Adicionar 30  $\mu$ L de  $K_4[Fe(CN)_6]$  0.01M.
9. Adicionar 10  $\mu$ L GOD.
10. Adicionar 10  $\mu$ L glucosa
11. Efectuar un barrido de -50 mV a 410 mV con una velocidad de 400 mV/minuto.
  
12. Repetir (6,7,8, 9, 10 y 11) con todas las concentraciones de glucosa.

### ***G) Cuantificación de Glucosa en la microcelda mediante cronoamperometría de pulso directo.***

1. Ensamblar los tres electrodos a la microcelda.
2. Limpiar el electrodo de oro.
3. Adicionar a la microcelda 50  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora de fosfatos  $\text{pH}=7.0$ .
4. Conectar los electrodos al equipo.
5. Fijar un potencial de 170 mV durante 1 minuto.
6. Limpiar la microcelda y secarla un pañuelo desechable.
7. Limpiar la superficie del electrodo de oro.
8. Adicionar 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  0.01M.
9. Adicionar 10  $\mu\text{L}$  GOD.
10. Adicionar 10  $\mu\text{L}$  glucosa
11. Fijar un potencial de 170 mV durante 1 minuto
  
12. Repetir (6, 7, 8, 9, 10 y 11) con todas las concentraciones de glucosa.

### ***H) Cuantificación de glucosa en una muestra de sangre.***

1. Limpiar el electrodo de oro.
2. Lavar la microcelda y secarla un pañuelo desechable.
3. Ensamblar los tres electrodos a la microcelda.
4. Conectar los electrodos al equipo.
5. Adicionar 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  0.01M.
10. Adicionar 10  $\mu\text{L}$  GOD.
11. Adicionar 10  $\mu\text{L}$  sangre\* (ver la página siguiente).
12. Fijar un potencial de 170 mV durante 1 minuto

\*Para obtener la muestra de sangre

1. Limpiar el dedo que se va a puncionar con etanol y una torunda de algodón.
2. Mantenerlo oprimido.
3. Puncionar con una lanceta estéril los lados del dedo.
4. Succionar con una micropipeta 10  $\mu$ L sangre.
5. Limpiar la zona puncionada.

## V Resultados y discusión

### 5 Resultados.

En primera instancia se cuantificó el peróxido de hidrógeno empleando microelectrodos de oro, platino y Carbón vítreo. En una celda de vidrio de 2 mL. Para mejorar la cuantificación de glucosa se modificó la propuesta original; ahora se cuantificará hexacianoferrito de potasio, sabiendo que éste es oxidado por el peróxido de hidrógeno producido *in-situ*. Acto seguido se procedió a construir la microcelda para la cuantificación de glucosa. En ésta se efectuaron curvas de calibración para la concentración de glucosa, hexacianoferrito de potasio y GOD. También en la microcelda se cuantificó la concentración de glucosa en una muestra de sangre.

#### *5.1 Cuantificación de $H_2O_2$ “estándar” con electrodos de diferentes materiales.*

La cuantificación  $H_2O_2$  estándar se realizó en una celda de vidrio de 2mL. Se emplearon electrodos en forma de disco de diferentes materiales (oro, platino y carbón vítreo) y adiciones de 100 $\mu$ L de  $H_2O_2$  0.01 M. La cuantificación se hizo mediante voltamperometría cíclica.

#### *Cuantificación de $H_2O_2$ “estándar” empleando un electrodo de Oro.*

Para poder apreciar la onda de electroxidación debida a presencia del peróxido de hidrógeno primero se efectuó un barrido del medio de reacción. Para lo cual se adicionó 1 mL de la solución amortiguadora de fosfatos 1M pH= 7 y acto seguido se efectuó una Voltamperometría cíclica bajo el siguiente programa de perturbación;  $E_o = -200$  mV,  $E_{inversión} = 1100$  mV y  $v = 300$  mV/min. Una vez terminado ese programa de perturbación se adicionó 100  $\mu$ L de  $H_2O_2$  0.01 M. Y se efectuó otro barrido en las mismas condiciones. Se procedió de la misma forma hasta haber adicionado 1 mL de  $H_2O_2$  0.01 M. Los voltamperogramas obtenidos se muestran en la Figura 5.1.

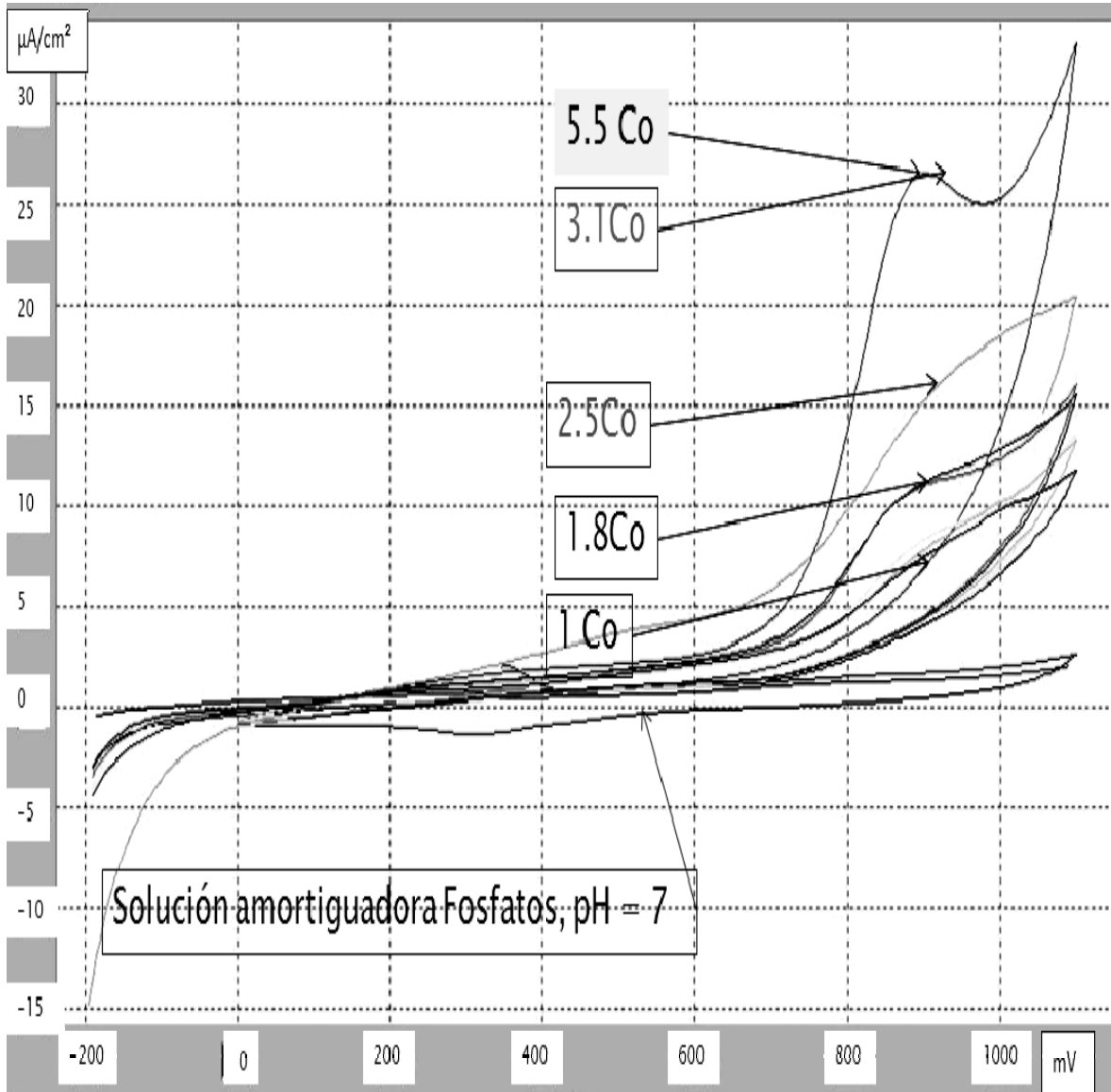


Figura 5.1, voltamperograma de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\text{Co}=0.9\text{mM}$ ). Se efectuaron los barridos en buffer de fosfatos  $\text{pH}=7$ ;  $E_0=-200$ ,  $v=500$  mV/ minuto,  $E_{\text{inversión}}=1100$  mV. ET= oro, EA=acero inoxidable, ER=  $\text{Ag}^\circ$ . Co= 0.9mM). Donde Co corresponde a la concentración total de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

En la Figura 5.1 se puede apreciar de forma cualitativa que la corriente de pico anódico crece de forma proporcional a la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  adicionada. Se aprecia que se incrementa la corriente de pico anódico hasta la quinta adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.01M, después de esta concentración se presenta una saturación del electrodo de oro.

A cada voltamperograma obtenido (Figura 5.1); se le extrapoló la línea base y se trazó una línea recta del punto mas alto de la onda de oxidación a la línea base extrapolada (véase Figura 5.2) se midió la corriente de pico anódico y se graficó contra la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  adicionado.

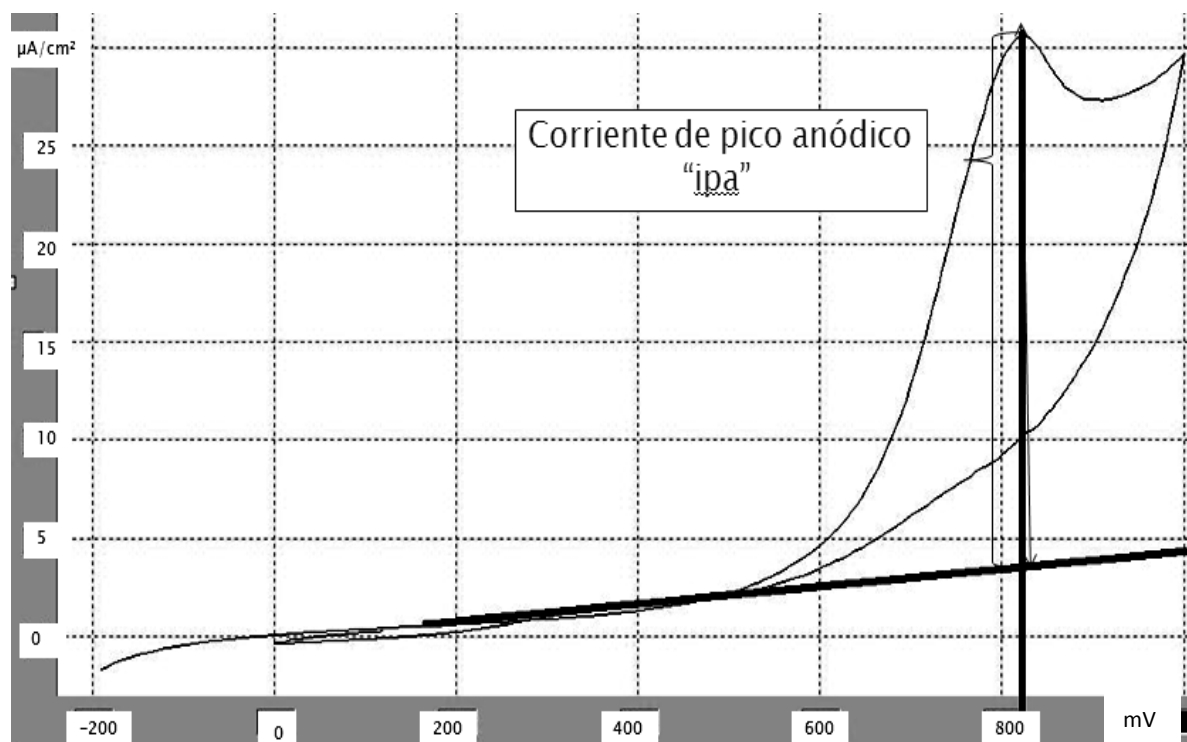


Figura 5.2, voltamperograma para una concentración 4.95mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se efectuaron los barridos en buffer de fosfatos 1 M pH=7, bajo el siguiente programa de perturbación;  $E_o = -200$ ,  $E_{\text{inversión}} = 1000$  mV,  $v = 500$  mV/ minuto. ET= oro, EA=acero inoxidable, ER=  $\text{Ag}^\circ$

Una vez que se tienen todos los valores de corriente de pico anódico; se trazó un gráfico de corriente de pico anódico contra la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  adicionado (Figura 5.3).

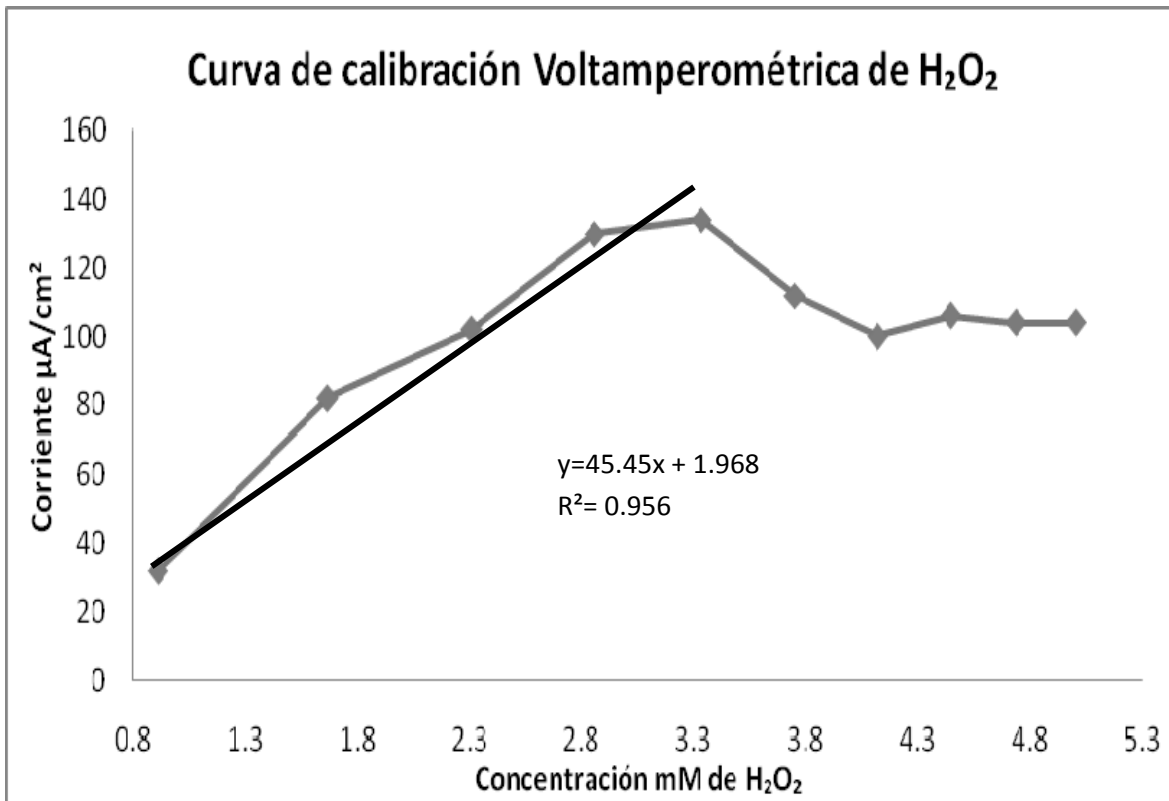


Figura 5.3. Curva de calibración voltamperométrica obtenida a partir de la corriente de pico anódico (Figura 5.2) y las respectivas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estándar adicionado.

En la Figura 5.3 se puede apreciar de forma cuantitativa como crece la corriente de pico anódico con respecto a la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicionado. Y se puede ver que el electrodo de oro (cuando se emplea una solución amortiguadora de fosfatos 1M pH= 7) se satura con concentraciones superiores a 3.3 mM.

En la Figura 5.3 se trazó una línea empleando los cinco primeros puntos. Y se puede apreciar una tendencia lineal y un excelente coeficiente de correlación lineal. A partir de lo anterior se puede concluir que el electrodo de oro y la solución amortiguadora de fosfatos 1M es útil para cuantificar peróxido de hidrógeno de 0.9 a 3.3 mM.



Debido a que los fosfatos se adsorben sobre el electrodo de oro se repitió el experimento pero ahora se va a emplear una solución amortiguadora de TRIS 0.5 M pH=8 en lugar de Fosfatos 1 M pH=7.

Se repitió el experimento previo y los voltamperogramas correspondientes a las últimas adiciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.01 M empleando TRIS 0.5 M como medio de reacción se muestran en la Figura 5.5.

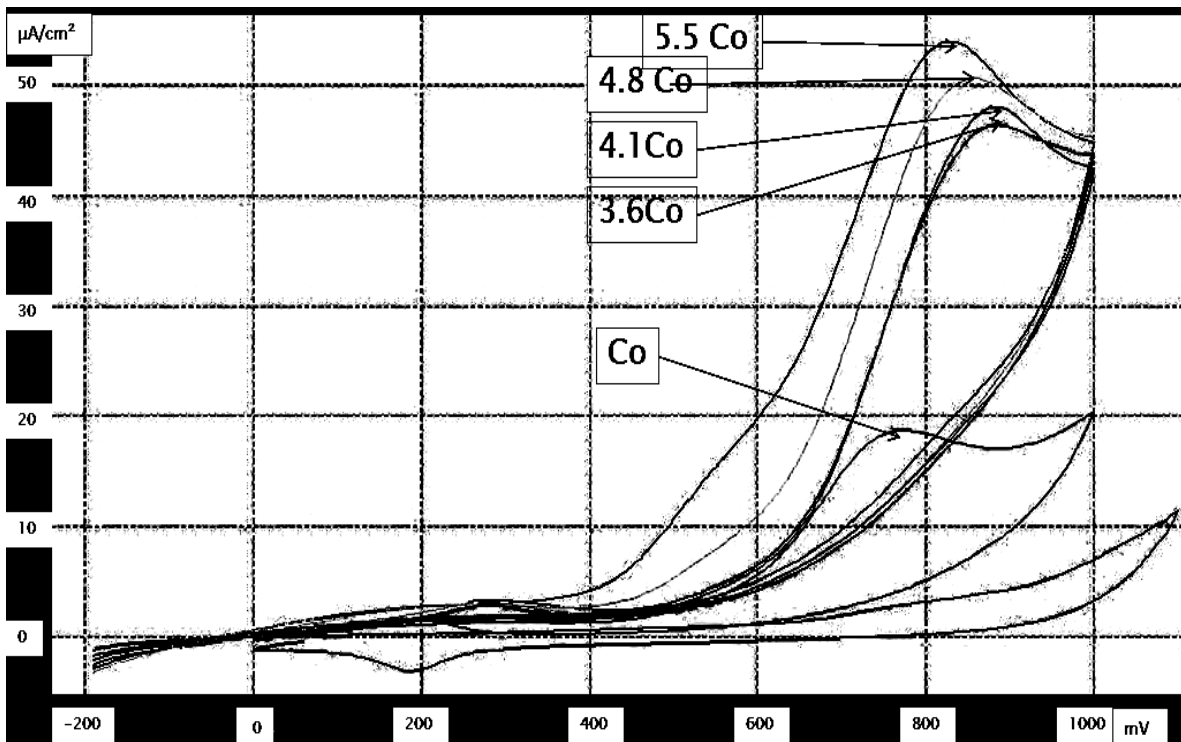


Figura 5. 4, voltamperograma de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en solución amortiguadora TRIS pH=8, bajo el siguiente programa de perturbación;  $E_0 = -200$ ,  $E_{\text{inversión}} = 1000$  mV,  $v = 500$  mV/ minuto. ET= oro, EA=acero inoxidable, ER=  $\text{Ag}^0$ . Donde Co es la concentración total de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; su valor corresponde a 0.9 mM.

En la Figura 5.4 se pueden apreciar los voltamperogramas correspondientes a las respectivas adiciones de 3.6 a 5.5 de Co. Dichas adiciones corresponden a un rango de 0.9 a 5.0 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El hecho de apreciar un incremento de la corriente de pico anódico nos indica que la superficie del electrodo de oro no se saturó en el intervalo de 0.9 a 5.0 mM. Esto nos comprueba que los fosfatos en una concentración de 1 M se adsorben sobre el electrodo de oro.

Se procedió de igual forma que el caso previo y se construyó el gráfico de corriente de pico anódico con respecto a la concentración de peróxido de hidrógeno adicionado y se muestra en la Figura 5.5.

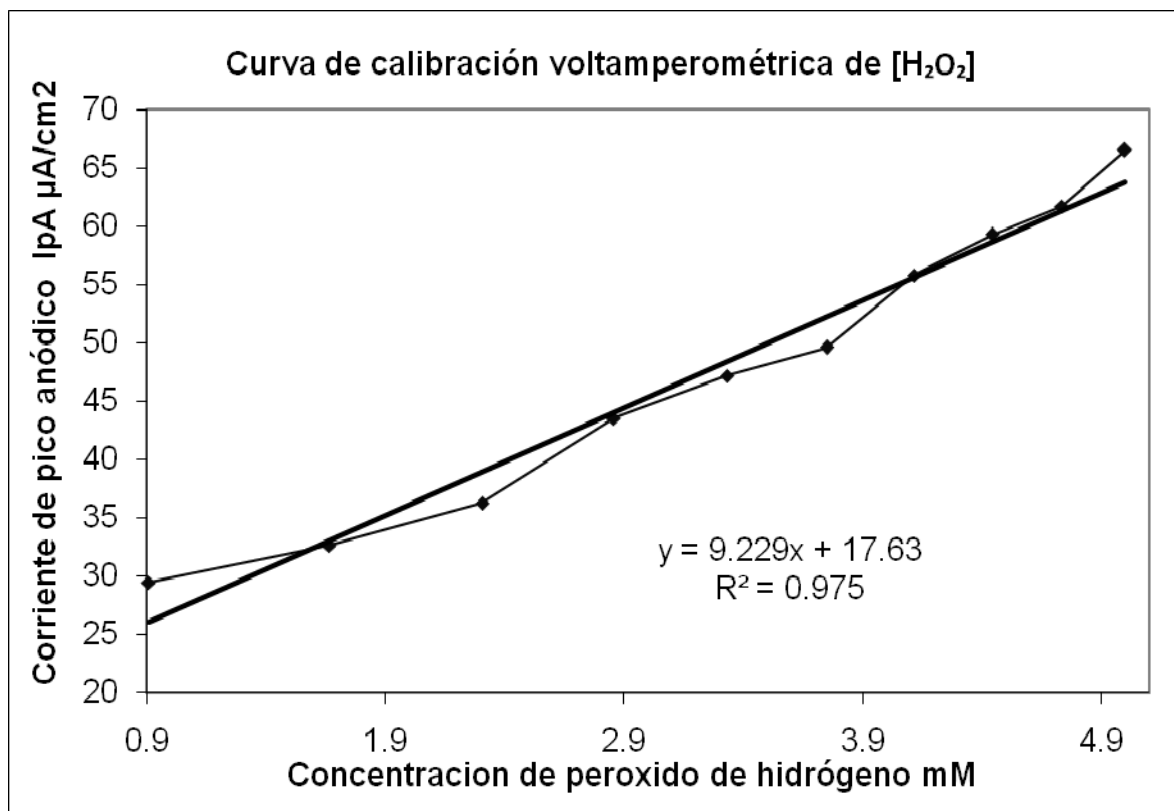


Figura 5.5 Curva de calibración voltamperométrica obtenida a partir de la corriente de pico anódico (Figura 5.5) y las respectivas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estándar adicionado.

En la Figura 5.5 se puede apreciar un coeficiente de correlación lineal ( $R^2=0.975$ ) y nos indica que el 97.5% de los datos se ajustan a un modelo de línea recta. Y nos indica que el electrodo de oro y la solución amortiguadora de TRIS pH= 8 son adecuadas para la cuantificación de peróxido de hidrógeno en un rango 0.9 a 5.0 mM. Cuando se uso solución amortiguadora TRIS, se logro cuantificar peróxido de hidrógeno en un rango mas amplio que cuando se usan fosfatos 1M pH=7.

### *Cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> “estándar” empleando un electrodo de Carbón vítreo.*

Para poder asociar la onda de electrooxidación debida a la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Se procedió igual que el caso previo; primero se efectuó un barrido del medio de reacción; 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos 1M pH= 7. Acto seguido se efectuó una Voltamperometría cíclica donde E<sub>o</sub>= -200 mV, E<sub>inversión</sub> = 1100mV y v= 500 mV/min. Al termino del barrido se agregó 0.1mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.01 M se efectuó un barrido en las mismas condiciones. Cuando terminó el barrido se repitió el mismo procedimiento hasta haber adicionado 1mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.01 M.

Mientras se efectuaban los experimentos se podían apreciar la aparición de pequeñas burbujas en la superficie del electrodo de carbón vítreo.

Los voltamperogramas obtenido se muestran en la Figura 5.6.

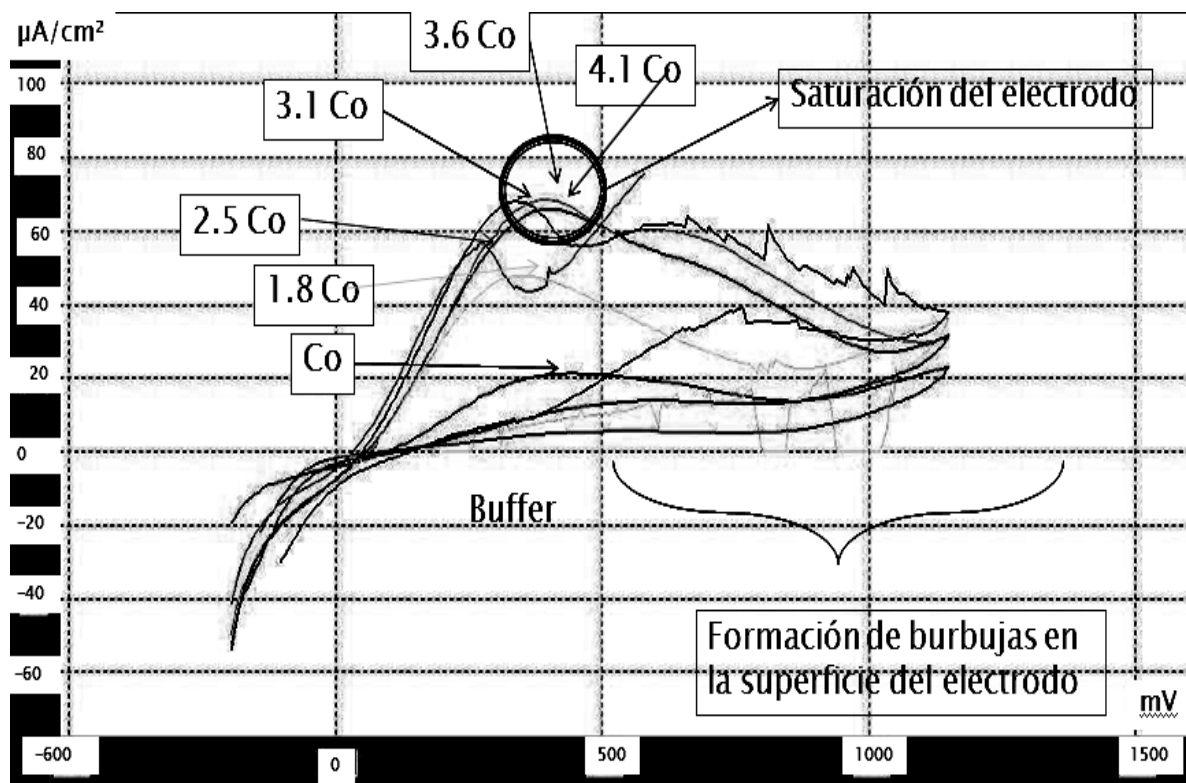


Figura 5. 6, voltamperograma de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.01M (Co=0.9mM). Se efectuaron los barridos en buffer de fosfatos pH=7 a una velocidad de 500 mV/ minuto, E<sub>i</sub>=-200 mV y E<sub>f</sub>= 1100 mV. ET= carbón vítreo, EA=acero inoxidable, ER= AgCl. Co corresponde a la concentración total de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En la Figura 5.6 se puede apreciar la saturación del electrodo de carbón vítreo cuando en el medio la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  supera los 2.79mM que corresponde a la cuarta adición de peróxido de hidrógeno 0.01M. Aunado a la saturación del electrodo de carbón vítreo se logra apreciar (en la Figura 5.7) la distorsión de los voltamperogramas debido a la presencia de las burbujas.

El experimento anterior se repitió tres veces y se obtuvieron los mismos resultados.

Se construyó la grafica de corriente de pico anódico con respecto a la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y se muestra a continuación.

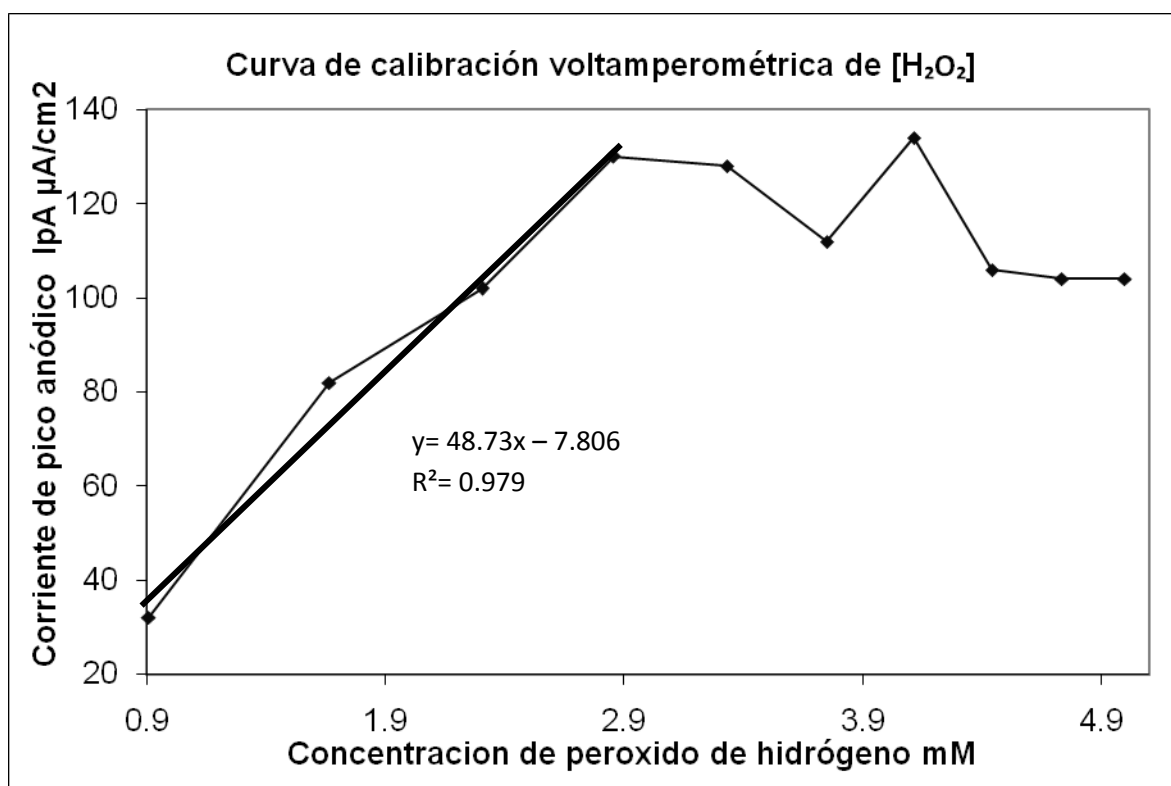


Figura 5.7. Curva de calibración voltamperométrica obtenida a partir de la corriente de pico anódico (Figura 5.6) y las respectivas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  estándar adicionado.

En la Figura 5.7 se puede apreciar de forma cuantitativa como aumenta la corriente de pico anódico con respecto a la concentración de  $H_2O_2$  adicionado. Y se puede apreciar una tendencia lineal para los cuatro primeros puntos. Se trazó una línea recta para poder obtener un coeficiente de correlación lineal y compáralo con los obtenidos previamente.

El coeficiente de correlación lineal corresponde a 0.979. Ese valor es el más cercano a 1 de todos los experimentos que se efectuaron. Lo cual nos dice que el 97.9 % de los datos obtenidos se acercan al modelo de una línea recta; debido a que existe menos dispersión en los datos obtenidos experimentalmente. Si embargo el intervalo de concentración es muy pequeño (de 0.9 y 2.9 mM) comparado con el rango de los experimentos previos.

### ***Cuantificación de $H_2O_2$ “estándar” empleando un electrodo de Platino.***

Se comenzó igual que en los dos casos previos; primero un barrido del medio de reacción (Fosfatos 1M pH= 7) y se empleó el mismo programa de perturbación. Acto seguido adiciones de 100  $\mu$ L de  $H_2O_2$  0.01 M. Hasta completar 1 mL.

Se apreció que al introducir el electrodo de platino en el medio de reacción cuando estaba presente el peróxido de hidrógeno, aparecían burbujas en la superficie del electrodo de platino.

Esto debido a que: El electrodo de platino al estar en contacto con el peróxido lo descompone en  $O_2$  y agua este hecho imposibilitó trazar los voltamperogramas respectivos.

Del conjunto de experimentos realizados se puede concluir que:

- a) El rango más amplio para la cuantificación de  $H_2O_2$  se logró empleando el electrodo de oro y la solución amortiguadora de TRIS 0.5 M pH=8.
- b) Si es posible cuantificar  $H_2O_2$  cuando se emplea un electrodo de oro y una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M siempre y cuando la concentra-

ción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el medio se encuentre comprendida en un rango de 0.9 a 3.3 mM. Recordando que en este trabajo se logro apreciar la saturación del electrodo de oro cuando se usa una solución amortiguadora de fosfatos 1M con concentraciones superiores a 3.3mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

- c) El electrodo de carbón vítreo presento el mejor coeficiente de correlación lineal. Sin embargo no solo presenta el rango mas limitado para la cuantificación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.9 a 2.8 mM) los voltamperogramas se distorsionan mucho debido a la aparición de burbujas y se deben de repetir los experimentos.
- d) La cuantificar  $\text{H}_2\text{O}_2$  empleando un electrodo de platino se imposibilita debido a la gran cantidad de burbujas que aparecen en la superficie del mismo.
- e) El electrodo de oro y la solución amortiguadora de TRIS 0.5 M pH=8, son los adecuados para la cuantificación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es un analito poco estable debido a que: se descompone por estar en contacto con la luz y elevada temperatura. Y la reacción mediante la es detectado produce  $\text{O}_2$  en la superficie del electrodo de trabajo. Lo antes mencionado dificulta la cuantificación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Por las razones antes mencionadas se adicionó  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  para mejorar la cuantificación de glucosa de acuerdo al siguiente esquema de reacción.

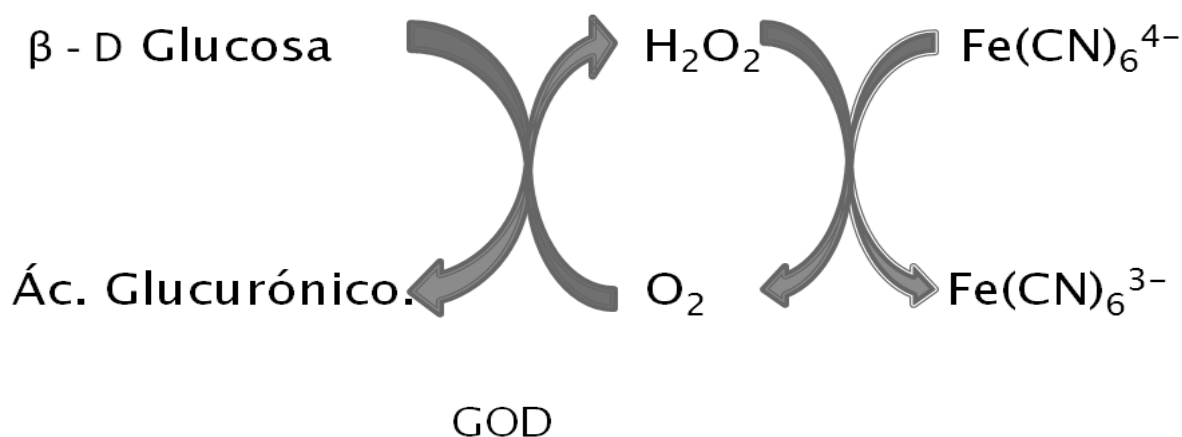


Figura 5.8. Esquema de reacción propuesto para la cuantificación de glucosa.

### ***5.2 Estudio del medio de reacción.***

Para tener un adecuado control del sistema de medición es necesario estudiar el comportamiento que presenta el medio de reacción; para lo cual se estudió el patrón de respuesta electroquímico del  $K_4[Fe(CN)_6]$ ,  $K_3[Fe(CN)_6]$  y mezclas de ambos en presencia de  $H_2O_2$ .

Para estudiar el comportamiento del medio de reacción se empleó una Voltamperometría de barrido lineal de corriente. Debido a que es una técnica analítica de alta sensibilidad, alta reproducibilidad y permite discernir entre varios analitos presentes <sup>[14,18]</sup>.

#### ***Comportamiento del $K_3[Fe(CN)_6]$ .***

Como en los estudios previos se comenzó la corrida de experimentos con un barrido del medio. Para lo cual se adiciono un mililitro de solución amortiguadora de TRIS 0.5 M pH=8 y se trazaron los voltamperogramas de barrido triangular de corriente bajo el siguiente programa de perturbación;  $I_o = -50 \mu A$ ,  $I_f = 70 \mu A$ ,  $v = 10 \mu A/min$ . La finalidad de trazar éste último es; conocer el comportamiento típico del medio de reacción y poder establecer cual es la respuesta asociada únicamente a la presencia del analito. Una vez que se ha trazado el voltamperograma se adicionó 0.1 mL de  $K_3[Fe(CN)_6]$  0.1 M y se repitió el mismo programa de perturbación.

Los voltamperogramas obtenido se muestran a continuación (Figura 5.9).

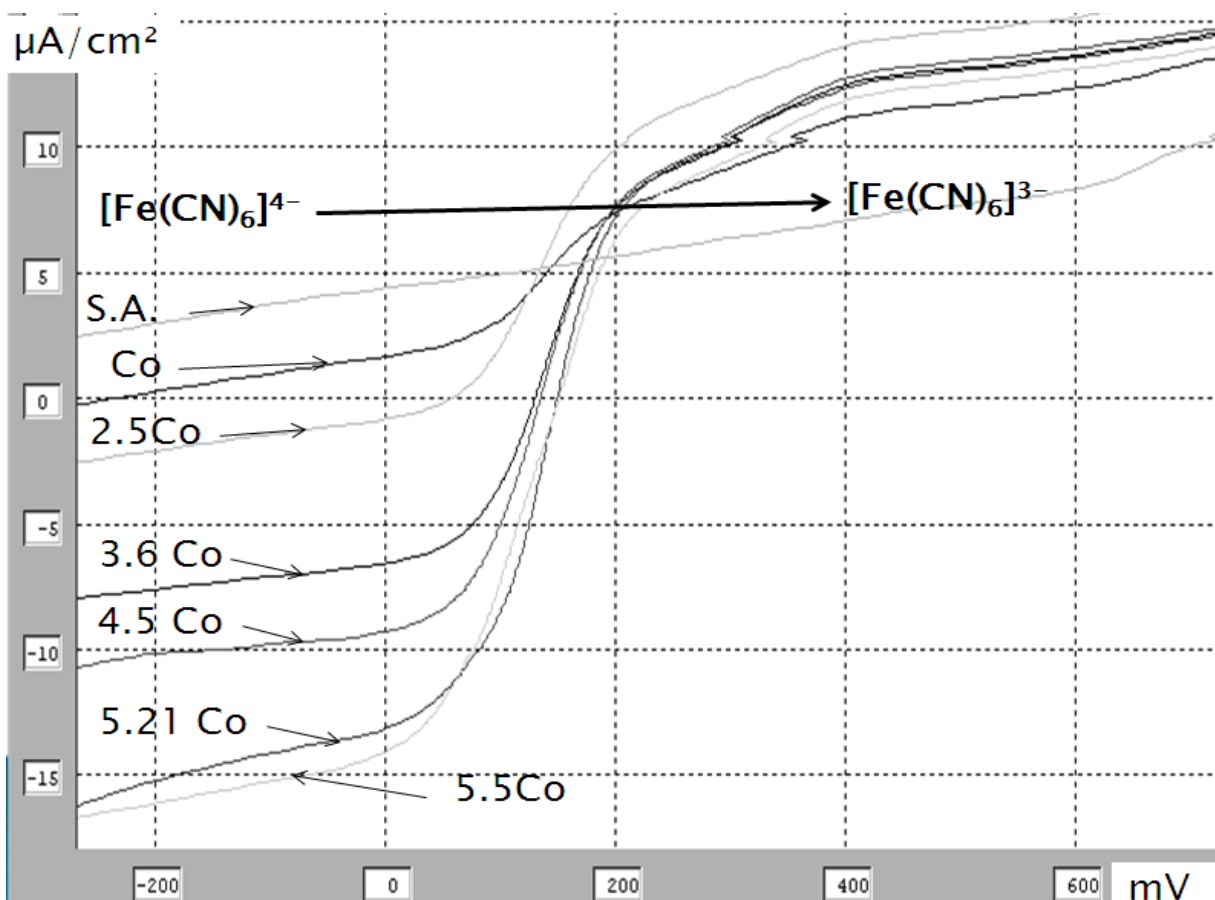


Figura 5.9, Fragmento de un voltamperograma de barrido triangular de corriente  $E=f(i)$  de  $K_3[Fe(CN)_6]$  en buffer TRIS pH=8, ET=Au<sup>0</sup>, ER= Ag<sup>0</sup>/AgCl, EA= Acero inoxidable. Programa de perturbación:  $i_0 = -50\mu A$ ,  $i_f = 70\mu A$ .  $v = 10$  mA/ min. "Co" corresponde a la concentración total de  $K_3[Fe(CN)_6]$  (Co=0.9mM) y "S.A." solución amortiguadora.

En la Figura 5.9 se puede apreciar que el  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  que se encontraba en las inmediaciones del electrodo de trabajo debido al bajo potencial se reduce a  $[Fe(CN)_6]^{4-}$  esto se infiere debido a que se detecta la onda de oxidación de  $[Fe(CN)_6]^{4-}$  a  $[Fe(CN)_6]^{3-}$ . También se aprecia que a medida que se incrementa la concentración inicial de  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  se incrementa la concentración  $[Fe(CN)_6]^{4-}$  que es oxidada a  $[Fe(CN)_6]^{3-}$ .

Para efectuar el grafico corriente límite en función de la concentración de  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  adicionada (Figura 5.11), se calculó la corriente limite haciendo lo siguiente. Se extrapolo la línea base como se muestra en la Figura 5.10, se trazó una línea recta partiendo de la cúspide de la onda, acto seguido se midió cuantos



centímetros hay entre la cúspide de la onda y la línea extrapolada, después de tener esa información los centímetros se convirtieron en  $\mu\text{A}$  efectuando una regla de tres. Este procedimiento se repitió para todos los voltamperogramas de la Figura 5.9.

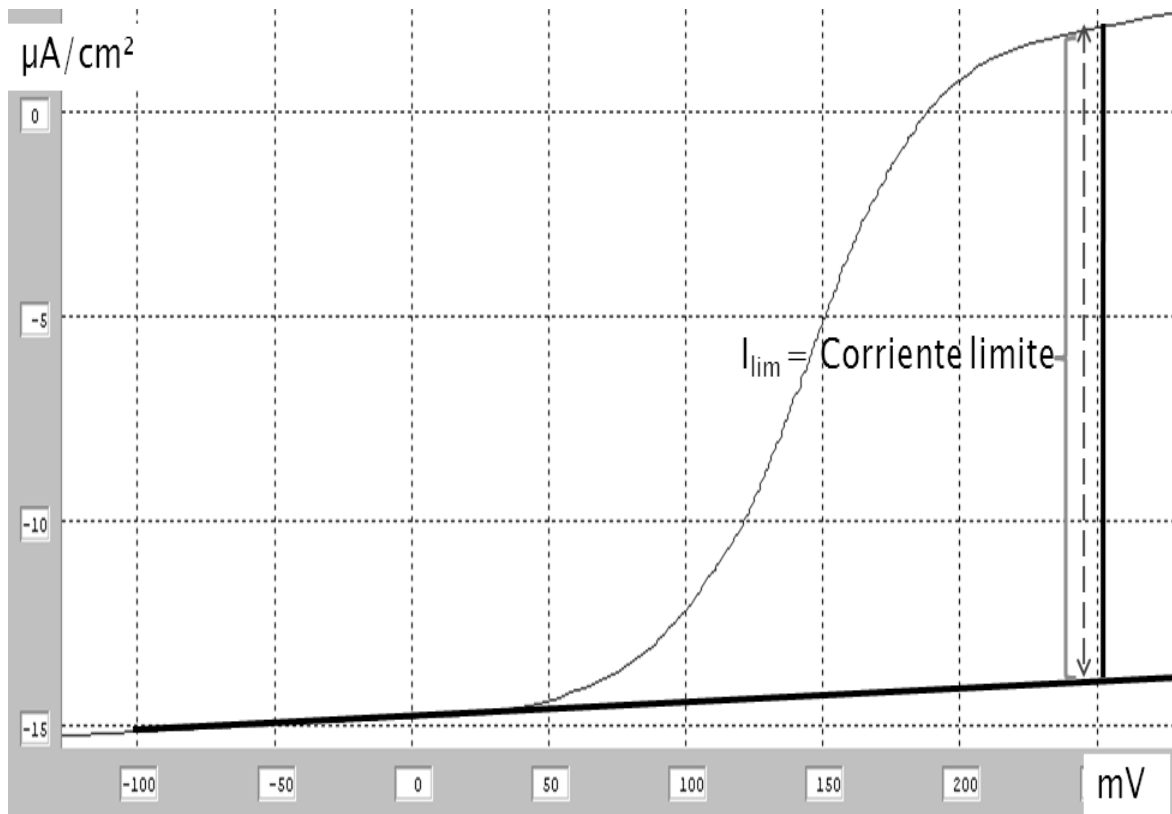


Figura 5.10, Fragmento de un voltamperograma de barrido triangular de corriente  $E=f(i)$  de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  en buffer TRIS pH=8,  $\text{ET}=\text{Au}^\circ$ ,  $\text{ER}=\text{Ag}^\circ/\text{AgCl}$ ,  $\text{EA}=\text{Acero inoxidable}$ . Programa de perturbación:  $i_0 = -50\mu\text{A}$ ,  $i_f = 70\mu\text{A}$ .  $v = 10 \text{ mV/min}$ .

Si asociamos los valores de corriente límite con la concentración de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  adicionado obtenemos la Figura 5.11.

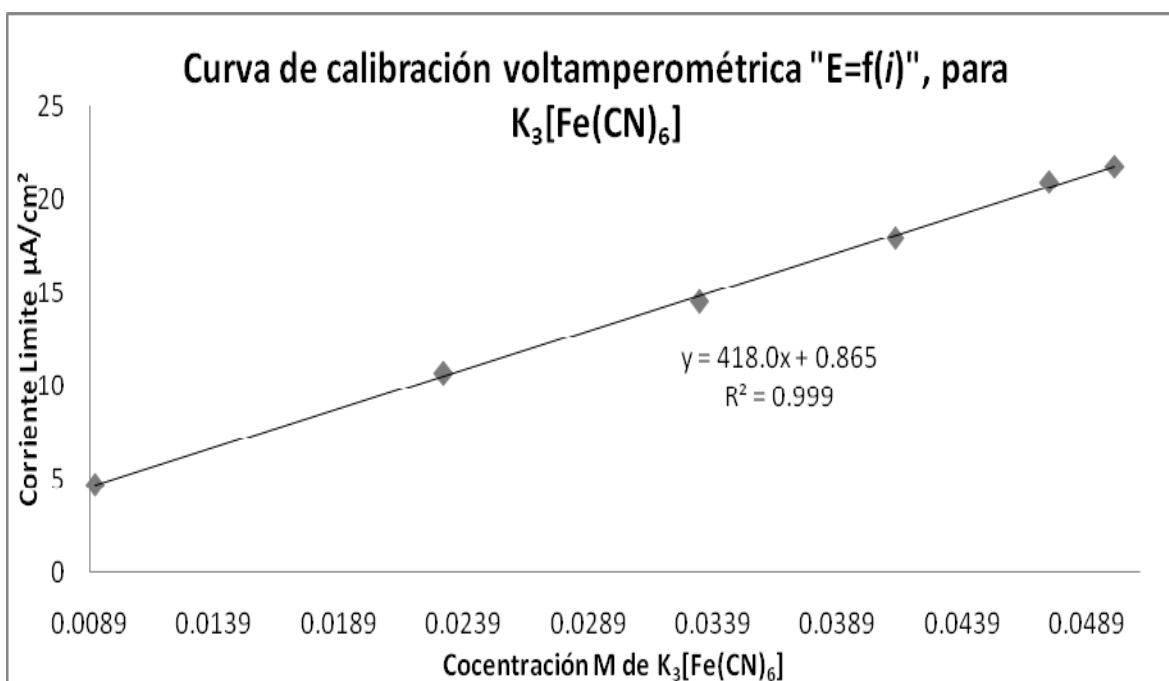


Figura 5.11. Curva de calibración voltamperométrica "E= f(i)" obtenida a partir de la corriente límite de los voltamperogramas de la Figura 5.11 y la concentración de  $K_3[Fe(CN)_6]$  estándar.

En la Figura 5.11 se puede apreciar un excelente coeficiente de correlación lineal  $R^2 = 0.999$  (muy cercano a 1) lo cual nos indica que el electrodo de oro y la solución amortiguadora TRIS 0.5 M pH=8 son adecuadas para la cuantificación de  $K_3[Fe(CN)_6]$ .

### ***Comportamiento del $K_3[Fe(CN)_6]$ en presencia de $H_2O_2$ .***

Para esta corrida analítica de experimentos se comenzó añadiendo 1 mL de  $K_3[Fe(CN)_6]$  0.1 M a la celda de vidrio, acto seguido se aplicó el siguiente programa de perturbación;  $I_o = 70 \mu A$ ,  $I_f = -50 \mu A$ ,  $v = 10 \mu A/min$  esta vez se inició el barrido de corriente en  $70 \mu A$  para evitar que el  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  sea reducido a  $[Fe(CN)_6]^{4-}$  y poder apreciar el comportamiento de  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  en presencia del  $H_2O_2$ . Al término de ese voltamperograma se adicionó 0.1 mL de  $H_2O_2$  0.01 M y se repitió el mismo programa de perturbación. Se repitió el mismo procedimiento hasta haber adicionado 1 mL de  $H_2O_2$  0.01 M

Los voltamperogramas se obtenidos aparecen ilustrados en la Figura 5.12

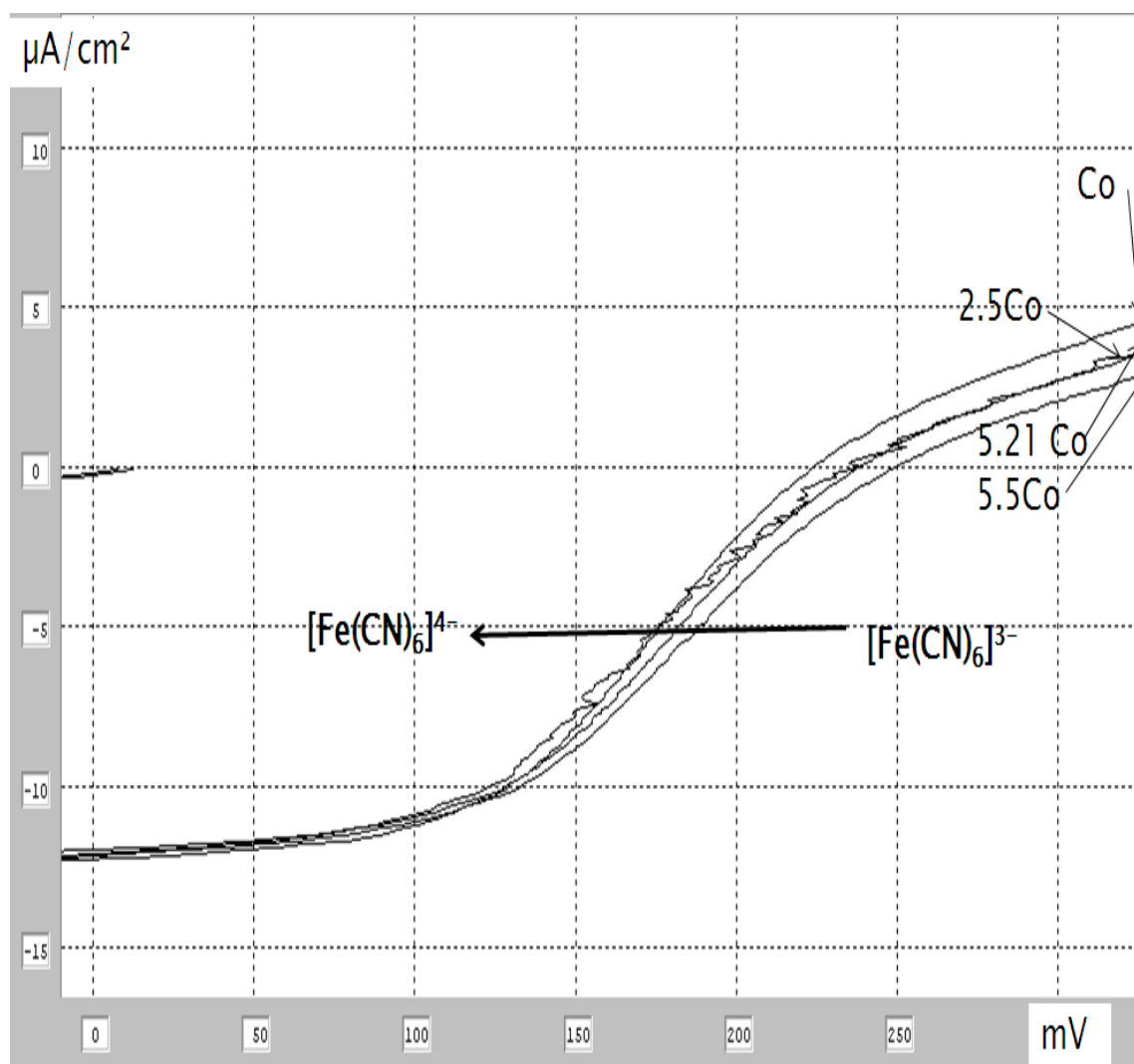


Figura 5.12, Fragmento de un voltamperograma de barrido triangular de corriente  $E=f(i)$  de  $K_3[Fe(CN)_6]$  en buffer TRIS pH=8, ET=Au<sup>0</sup>, ER= Ag<sup>0</sup>/AgCl, EA= Acero inoxidable. Programa de perturbación:  $i_0= 70\mu A$ ,  $i_t= -50\mu A$ .  $v =10$  mV/ min. "Co" corresponde a la concentración total de  $H_2O_2$  en el medio ( $Co=0.9mM$ ).

En la Figura 5.12 no se puede apreciar una clara relación entre la concentración de  $H_2O_2$  adicionada al medio y la concentración de  $K_3[Fe(CN)_6]$ . Para poder apreciar mejor el comportamiento se construyeron los gráficos de corriente limite en función de la concentración de  $H_2O_2$  que se muestran en seguida (Figura 5.13).

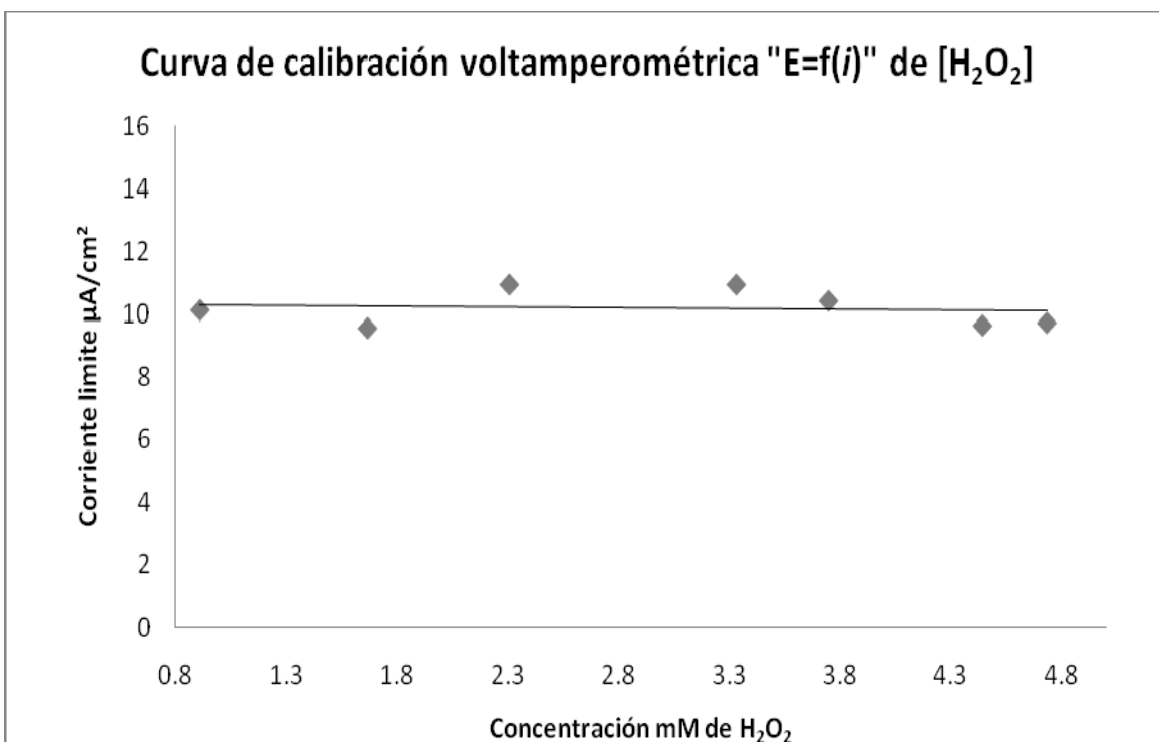


Figura 5.13 Curva de calibración voltamperométrica "E= f(i)" obtenida a partir de la corriente límite de los voltamperogramas de la Figura 5.14 y la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estándar en el medio de reacción.

En la Figura 5.13 se puede apreciar de una forma clara que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no reaccionó con el [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup> por que la concentración de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup> que se reduce a [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup> permanece casi constante sin importar cuanto H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se adicione al medio.

#### ***Comportamiento del K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.***

Se procedió de la misma manera que para el caso de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y solo se cambio el valor de I<sub>o</sub> que corresponde a -50 μA y el de I<sub>f</sub> corresponde a 70 μA. Para evitar que el [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup> no se oxide a [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup> y de esta forma se pueda estudiar el comportamiento del [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup> en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

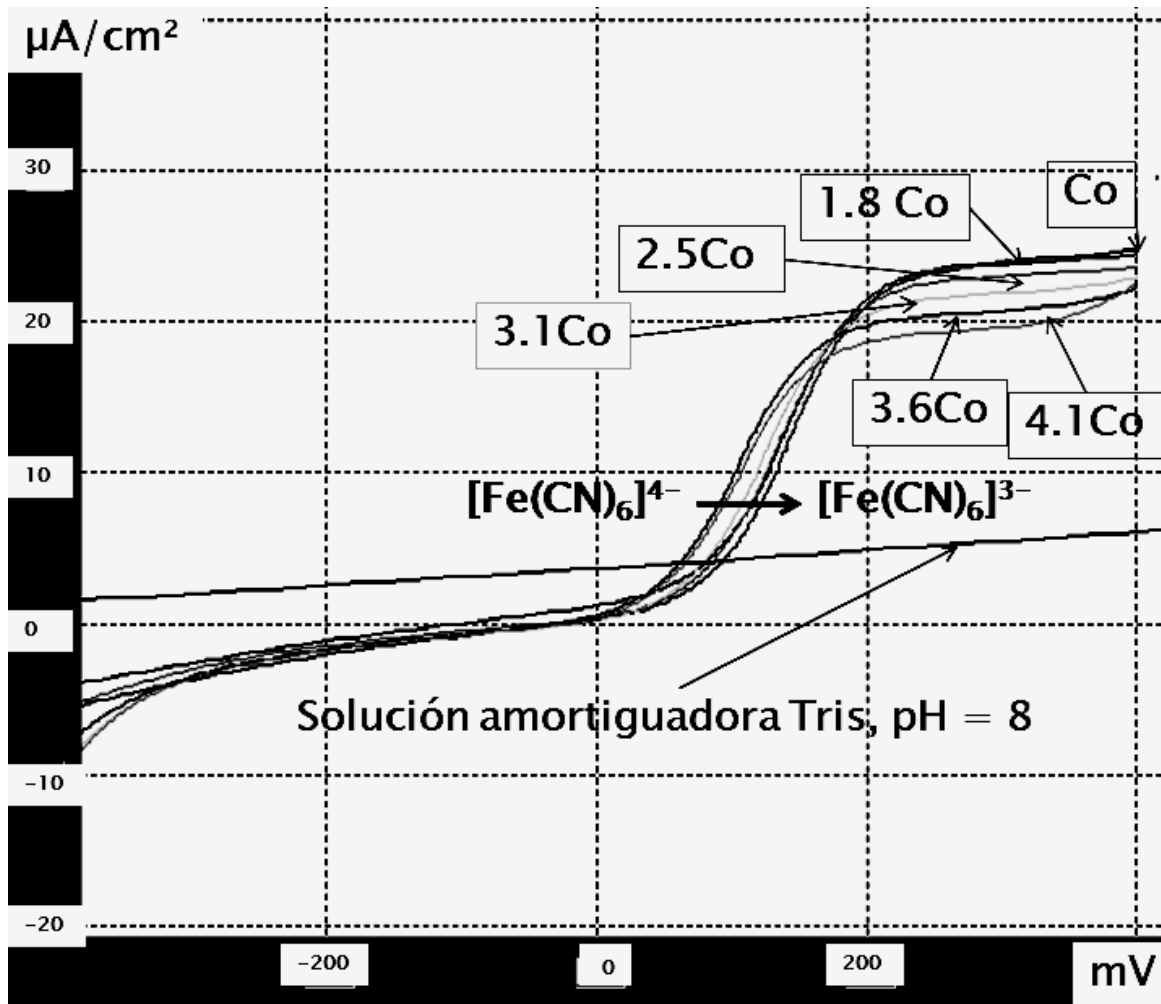


Figura 5.14, Fragmento de un voltamperograma de barrido triangular de corriente  $E=f(i)$  de  $K_4[Fe(CN)_6]$  en buffer TRIS pH=8, ET=Au<sup>0</sup>, ER= Ag<sup>0</sup>/AgCl, EA= Acero inoxidable. Programa de perturbación:  $I_0 = -50\mu A$ ,  $I_1 = 70\mu A$ .  $v = 10$  mV/min. "Co" corresponde a la concentración total de  $H_2O_2$  en el medio ( $Co = 0.9$  mM).

Desde la Figura 5.14 se puede apreciar como se disminuye la concentración de  $[Fe(CN)_6]^{4-}$  que se oxida a  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  debido a la presencia del  $H_2O_2$ .

Del mismo modo que para casos anteriores se construyó el gráfico corriente límite contra la concentración de  $H_2O_2$  adicionado y se muestra enseguida.

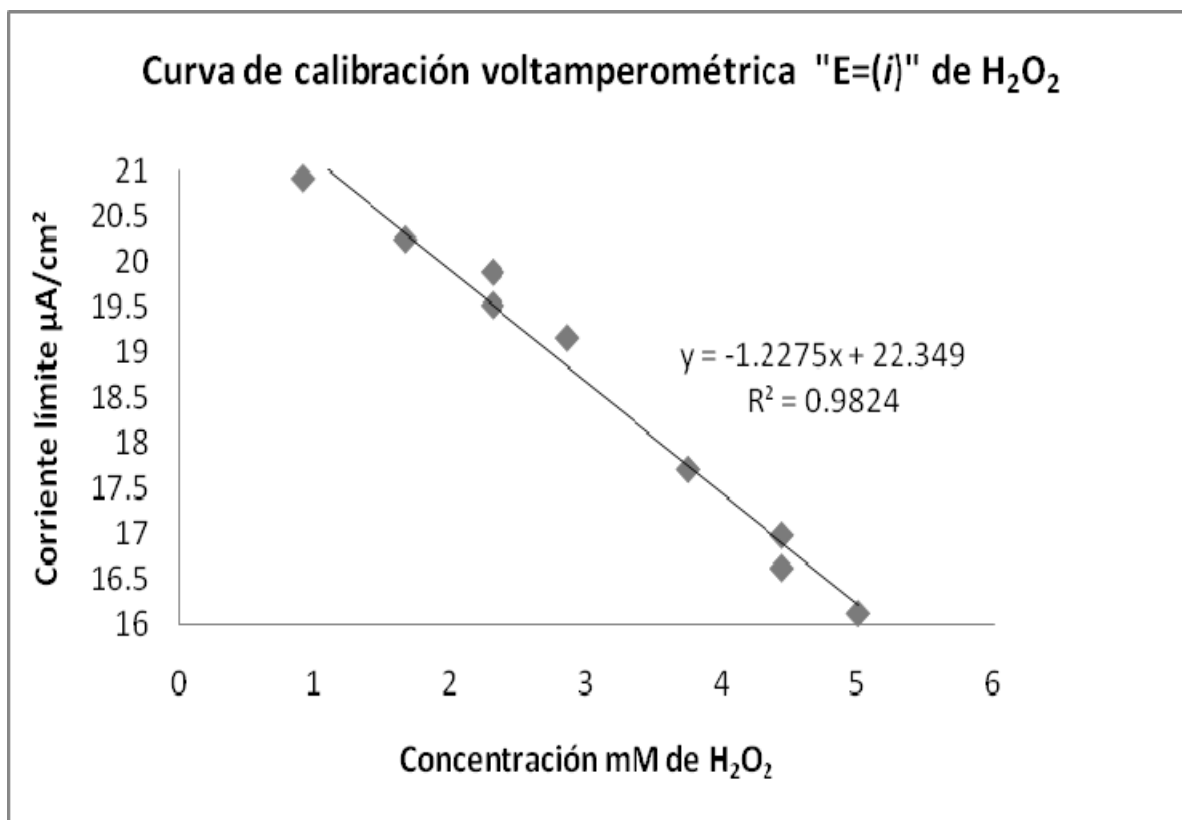


Figura 5.15 Curva de calibración voltamperométrica "E= f(i)" obtenida a partir de la corriente límite de los voltamperogramas de la Figura 5.16 y la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estándar en el medio de reacción.

En la Figura 5.15 se puede ver que existe estrecha relación entre la cantidad de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  y la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El coeficiente de correlación cercano a la unidad nos indica que es una relación lineal y que a medida que se incrementa el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> desaparece el  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ . Esto nos indica que de alguna manera la desaparición del  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  esta ligada a la presencia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Comportamiento del  $K_4[Fe(CN)_6]$  y  $K_3[Fe(CN)_6]$ .**

Para la construcción de los voltamperogramas primero se adicionó al medio 1 mL de solución amortiguadora de TRIS pH= 8, se efectuó un barrido triangular de corriente comenzando  $-50 \mu A$  y a una velocidad de  $10 \mu A / \text{minuto}$  se llegó a  $70 \mu A$ . Después se añadió  $100 \mu L$  de una mezcla de  $0.1 M$  de  $K_4[Fe(CN)_6]$  y  $K_3[Fe(CN)_6]$ , se efectuó otro barrido en las mismas condiciones se añadieron otros  $100 \mu L$  de la misma mezcla y se continuó así hasta haber completado  $1 mL$ .

Los voltamperogramas se muestran en la Figura 5.16 se aprecia como crecen la cantidad  $Fe(CN)_6^{3-}$  y  $Fe(CN)_6^{4-}$  debido a las adiciones de la mezcla de los dos compuestos.

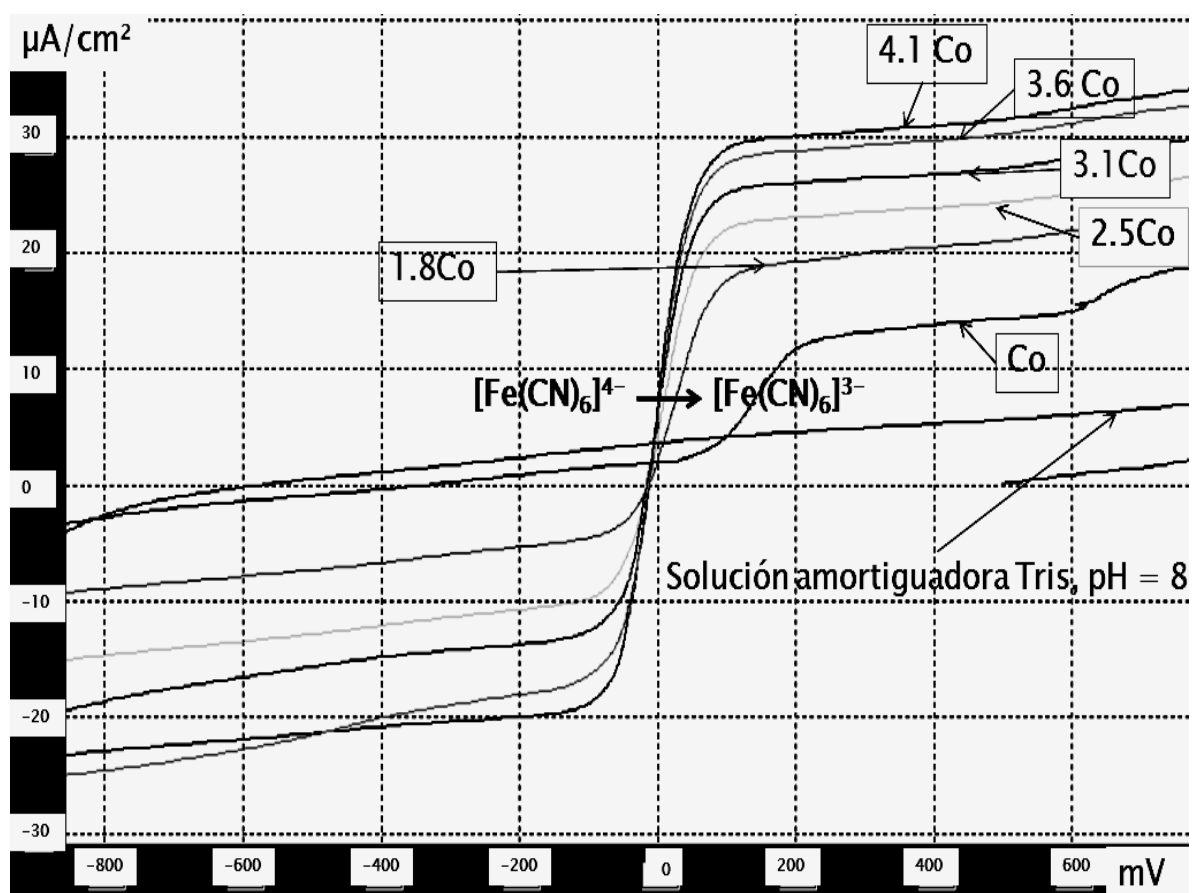


Figura 5.16, Fragmento de un voltamperograma de barrido triangular de corriente  $E=f(i)$  de  $K_4[Fe(CN)_6]$  en buffer TRIS pH=8, ET=Au<sup>0</sup>, ER= Ag<sup>0</sup>/AgCl, EA= Acero inoxidable. Programa de perturbación:  $i_0 = -50 \mu A$ ,  $i_f = 70 \mu A$ .  $v = 10 \text{ mA} / \text{min}$ . "Co" corresponde a la concentración  $K_4[Fe(CN)_6]$  y  $K_3[Fe(CN)_6]$  total en el medio (Co=0.09 M para ambos).

Se construyó la gráfica corriente límite en función de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como en los casos previos y se muestra a continuación.

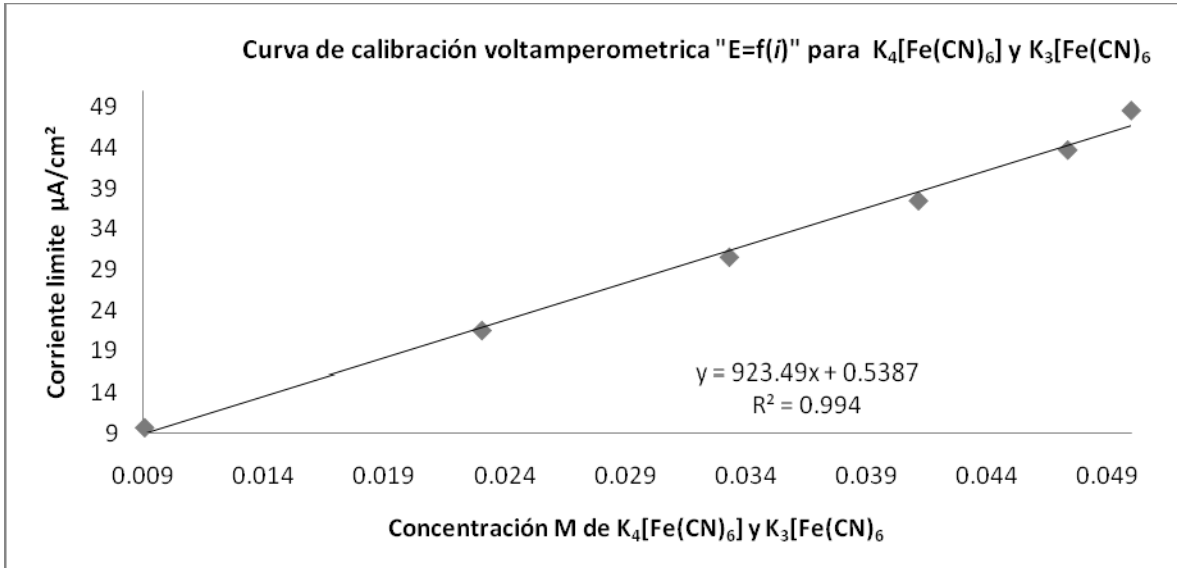


Figura 5.17 Curva de calibración voltamperométrica "E= f(i)" obtenida a partir de la corriente límite de los voltamperogramas de la Figura 5.18 y la concentración de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  y  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  estándar.

De la serie de experimentos previos se puede afirmar que:

- A) La concentración de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  permanece constante conforme se adiciona al medio  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- B) La concentración de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  varía de manera inversamente proporcional y de manera lineal a medida que se incrementa la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- C) Con la información previa se puede afirmar que ocurre lo indicado en la Figura 5.10.

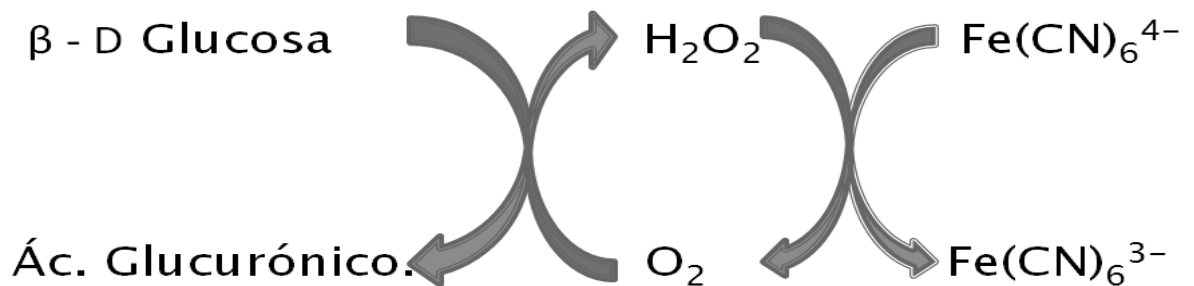


Figura 5.10. Esquema de reacción propuesto para la cuantificación de glucosa.



D) Por los argumentos antes mencionados no se empleara  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  en los experimentos siguientes debido a que electroquímicamente no se puede apreciar una relación entre la presencia de este compuesto y el  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

***Una vez estudiado el medio de reacción se procedió a construir la microcelda para la cuantificación de glucosa.***

### ***5.3 Construcción de la microcelda.***

El dibujo de la microcelda de volumen fijo para la cuantificación de glucosa se muestra en la Figura 5. 18.

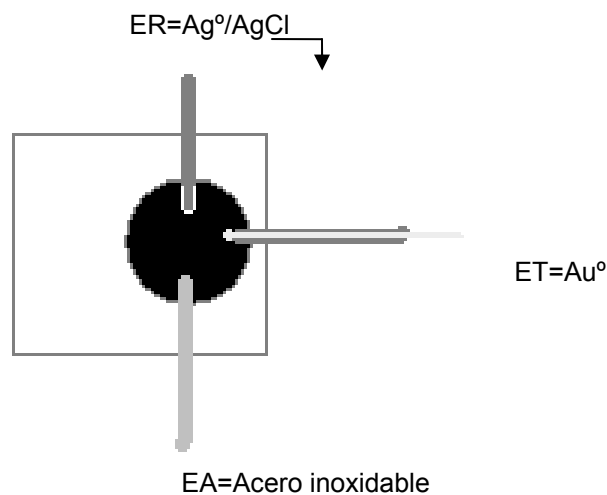


Figura 5.18 Diagrama de la microcelda empleada para la cuantificación de glucosa, donde ER= electrodo de referencia, ET= electrodo de trabajo, EA= electrodo auxiliar.

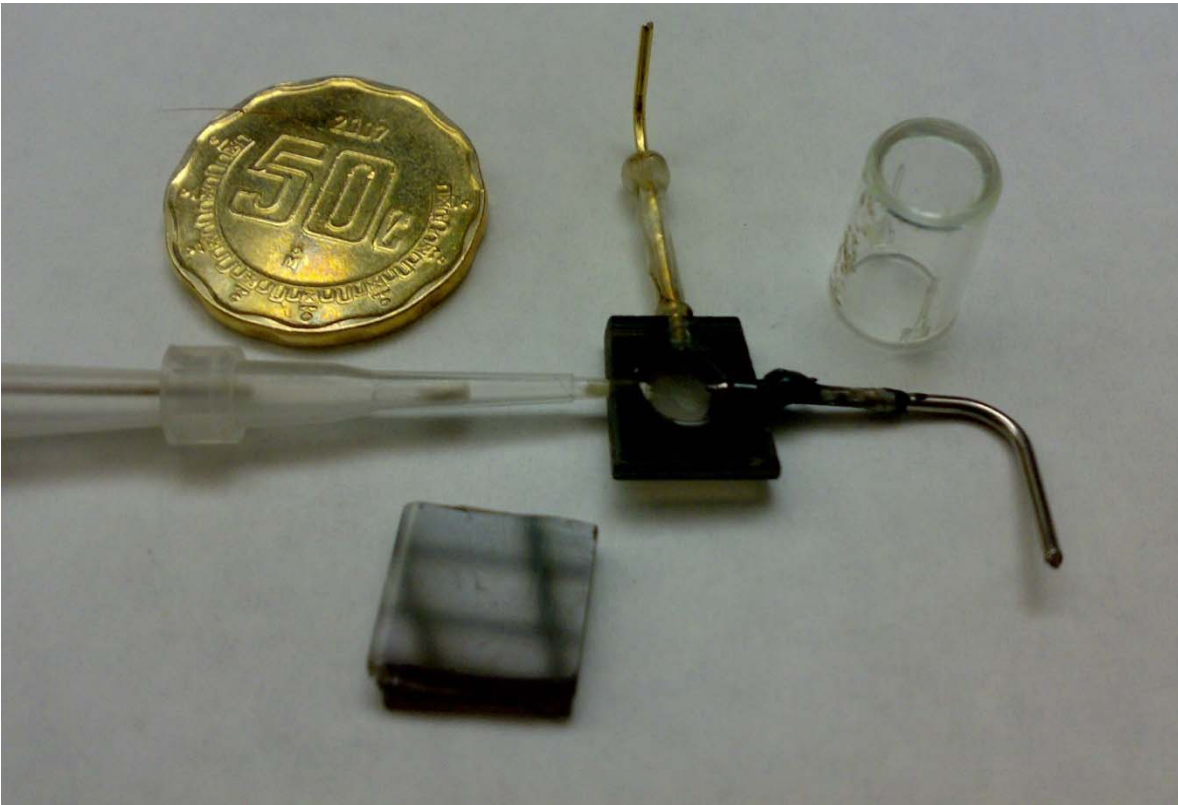


Figura 5.19 Fotografía de la microcelda empleada para la cuantificación de glucosa.

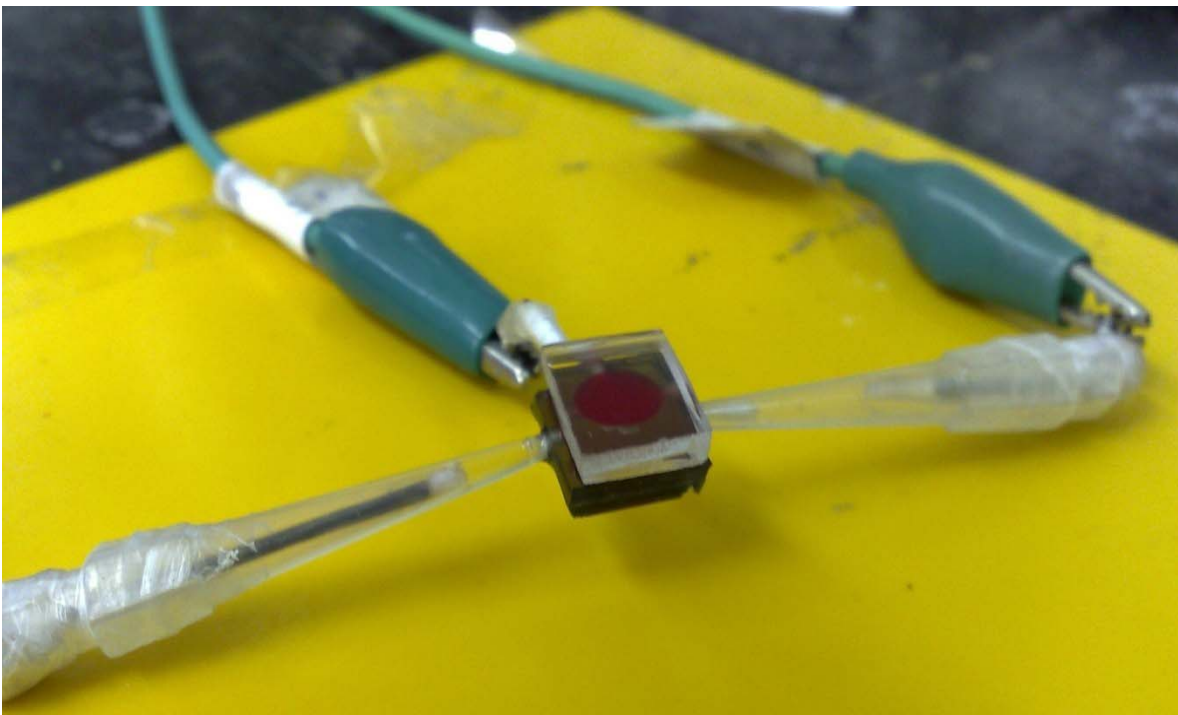


Figura 5.20 Fotografía de la microcelda empleada para la cuantificación de glucosa. Con una muestra de sangre y funcionando.

En la Figura 5.19 se puede apreciar la microcelda construida. El área de la microcelda corresponde a  $1\text{cm}^2$ . La capacidad de la misma es de  $50\ \mu\text{L}$ . En la Figura 5.20 se pueden apreciar que el tamaño de los microelectrodos es muy reducido.

El diseño permite que la microcelda no ocupe mucho espacio, facilita su almacenamiento y limpieza, permite el uso de poca muestra y reactivos e impide que la muestra se derrame.

La microcelda fue construida con elementos de bajo costo; un pedazo de acrílico de  $1\ \text{cm}^2$ , un pedazo de alambre de oro de 3 cm de longitud y un milímetro de diámetro (apx), un fragmento de acero inoxidable 3 cm de longitud y un milímetro de diámetro y puntas de micropipeta.

### ***5.3.1 Cuantificación de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.1 M en la microcelda.***

Para estudiar el patrón de respuesta del  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  se construyó una curva de calibración voltamperométrica.

#### ***Voltamperometria***

Se comenzaron los experimentos efectuando un barrido del medio, en este caso se uso solución amortiguadora de fosfatos 0.5 M pH= 7. Se preparó una solución 0.1 M de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  y apartir de ella (y empleando la solución amortiguadora de fosfatos) se prepararon diluciones diluciones 1/10, 2/10, 3/10, 4/10, 5/10, 6/10, 7/10, 8/10 y 9/10. Se depositó  $60\ \mu\text{L}$  de solución amortiguadora de fosfatos en la microcelda construida y se aplicó el siguiente programa de perturbación:  $E_o = -250\text{mV mV}$ ,  $E_{\text{inversión}} = 410\ \text{mV}$  y  $v = 300\ \text{mV/min}$ . Se limpió la microcelda y se añadieron  $60\ \mu\text{L}$  de la dilución 1/10 y se repitió el mismo programa de perturbación. Se repitió el mismo procedimiento con todas las diluciones.

Y los voltamperogramas obtenidos se muestran en la Figura 5.21.

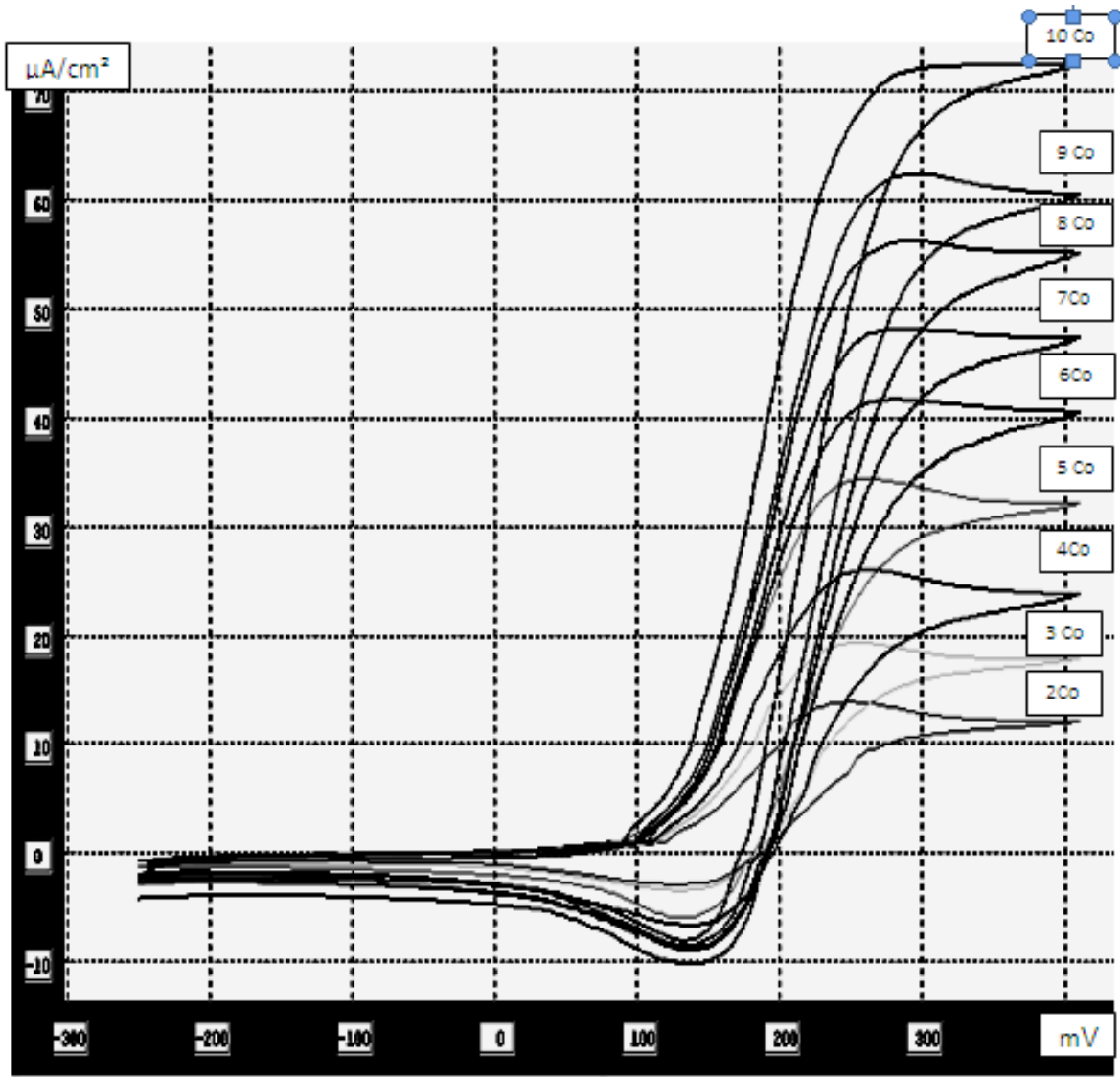


Figura 5.21. Voltamperogramas de  $K_4[Fe(CN)_6]$  en solución de fosfatos 0.5 M pH= 7 y  $Co= 0.01M$ . Obtenido en la microcelda construida ET=oro, ER=  $Ag^0/AgCl$ , EA= Acero ioxidable.  $E_o = -250mV$  mV,  $E_{inversión}= 410$  mV y  $v = 300$  mV/min.

En la Figura 5.21 se puede apreciar un claro incremento proporcional en la corriente de pico anódico con respecto a la concentración de  $K_4[Fe(CN)_6]$ .

Como se muestra en la Figura 5.2 se obtuvieron los valores de corriente de pico anódico de los voltamperogramas en la Figura 5.21. Con los valores de pico anódico aunado a las concentraciones de  $K_4[Fe(CN)_6]$  presente en la microcelda se puede construir la curva de calibración mostrada en la Figura 5.22.

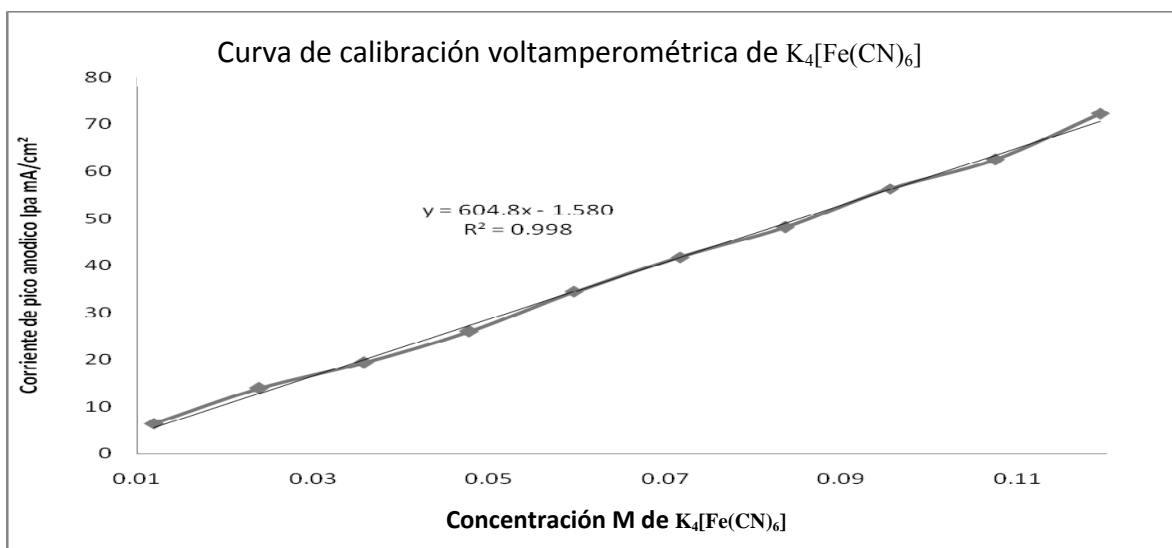


Figura 5.22 Curva de calibración voltamperométrica obtenida a partir de la corriente de pico anódico (Figura 5.23) y las respectivas concentraciones de  $K_4[Fe(CN)_6]$  adicionado a la microcelda construida.

En la Figura 5.22 se puede apreciar un coeficiente de correlación cercano a 1. Lo cual nos indica que más del 99.8 % de los datos obtenidos se ajustan a una línea recta. Ese elevado coeficiente de correlación lineal nos indica que la serie de experimentos se hizo bien, que el método es adecuado para cuantificar  $K_4[Fe(CN)_6]$  en un intervalo de 0.01 a 0.1 M.

### 5.3.2 Cuantificación de $K_4Fe(CN)_6$ 0.01 M en la microcelda.

Una vez que se ha verificado que la celda puede cuantificar  $K_4[Fe(CN)_6]$  se procedió a repetir el ensayo con soluciones diluidas 1:10 debido a que el valor de concentración de glucosa en una persona normal antes de las comidas corresponde a 60-120 mg/dL, que corresponden a  $(6.66 - 3.33) \times 10^{-3}$  M.

Para hacer los voltamperogramas se adicionaron 60  $\mu$ L de las concentraciones 0.01M y diluciones en un intervalo de 1.66 a 10 mM. Se tapó la microcelda con un pedazo de acrílico transparente, procediendo de la misma forma se programaron secuencias en las cuales se barrió de -50 a 410 mV con una velocidad de barrido de 400 mV/minuto. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.23.

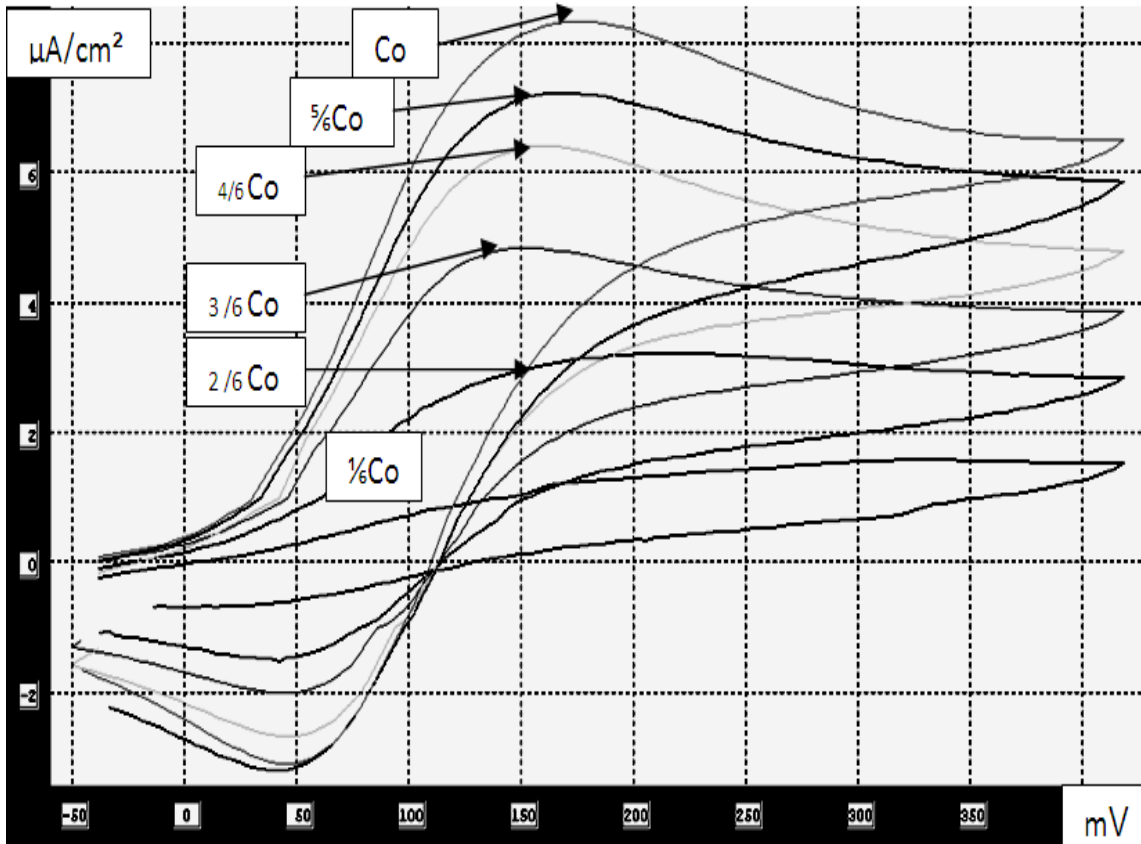


Figura 5.23. Voltamperogramas obtenidos en la microcelda construida,  $V = 60 \mu\text{L}$  de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  y  $\text{Co} = 0.01 \text{ M}$ . ET=oro, ER=  $\text{Ag}(\text{s})|\text{AgCl}(\text{s})|\text{NaNO}_3(0.1\text{M})|\text{NaNO}_3(0.1\text{M})$ ; EA=Acero inoxidable.  $E_o = -250 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{inversión}} = 410 \text{ V}$ ,  $v = 400 \text{ mV/min}$ .

En los voltamperogramas obtenidos (Figura 5.23) se puede apreciar un claro incremento proporcional en la corriente de pico anódico con respecto a la  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ .

Los valores de corriente de pico anódico aunados a los datos de concentración de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  fueron empleados para efectuar las respectivas curvas de calibración que se muestra en la (Figura 5.24).

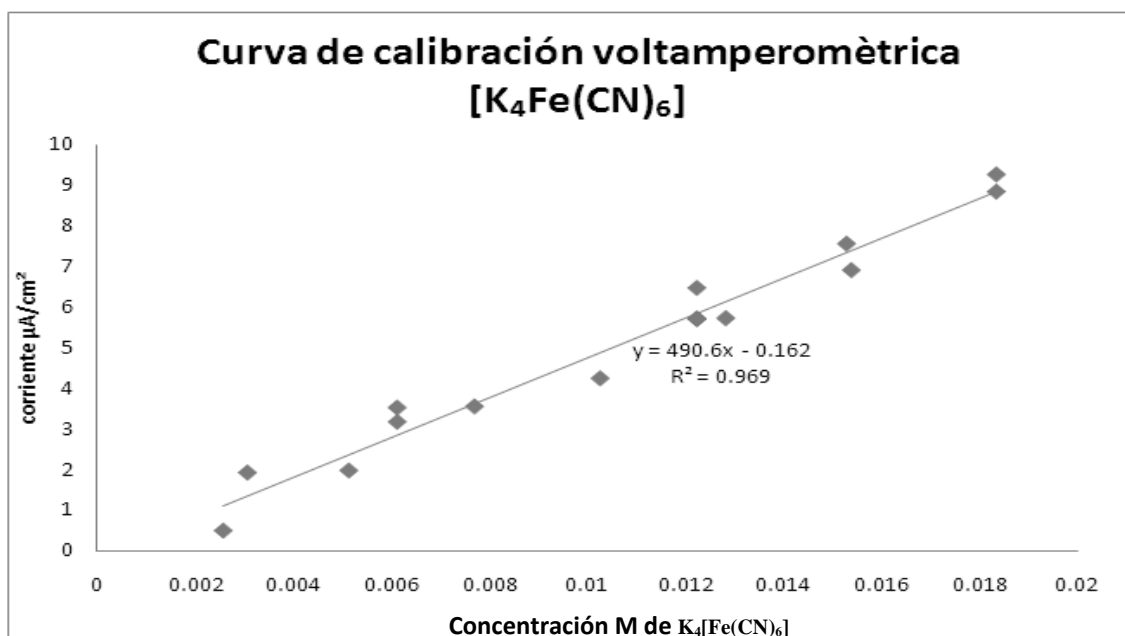


Figura 5.24, Curva de calibración voltamperométrica obtenida a partir de la corriente de pico anódico y las respectivas concentraciones de K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] estándar adicionado a la microcelda construida.

La Figura 5.24 se puede apreciar un coeficiente de correlación lineal de 0.969 que es muy cercano a 1 y nos indica una buena relación lineal.

Cuando se trabajó diez veces más concentrado se obtuvo un coeficiente de correlación lineal más elevado lo cual nos indica que la metodología empleada para efectuar las diluciones no está siendo adecuada y como consecuencia se está perdiendo precisión. Yo atribuyo esto a que se emplearon varias micropipetas para efectuar las diluciones.

### Cronoamperometría

La meta de construir la microcelda para detectar glucosa es conectarla al MIMP (Minimal Instrumentation Micro Polarograph) que es un equipo de mínima instrumentación, de bajo costo, elaborado también en el laboratorio. Para obtener un voltamperograma usando el MIMP se tiene que fijar un potencial durante 30 segundos para tener un punto de la gráfica y si se muestrea cada 50 mV tardaríamos alrededor de cinco minutos para hacer un voltamperograma. Esto se puede reducir a 30 segundos si fijamos el MIMP en un potencial y efectuamos cronoam-



perometría. Retomado, una vez que se ha corroborado que en la microcelda se pueden detectar concentraciones de  $K_4[Fe(CN)_6]$  en un rango de 1.66 a 10 mM ya no se emplearán mas voltamperometrias debido a la finalidad con la cual se construyó la celda.

En los siguientes estudios se tratará de evaluar el efecto del número de compartimentos; para lo cual se hicieron cinco curvas de calibración empleando un diferente número de compartimentos para el electrodo de referencia y auxiliar<sup>4</sup>.

Para cada ensayo se adaptó al electrodo auxiliar y referencia un número de compartimentos de acuerdo con la Tabla 5.1, se adicionó la concentración respectiva de  $K_4[Fe(CN)_6]$  y se fijó el potencial de pico anódico (170mV) durante 60 segundos, se trazaron los cronoamperogramas respectivos (Figura 5.25).

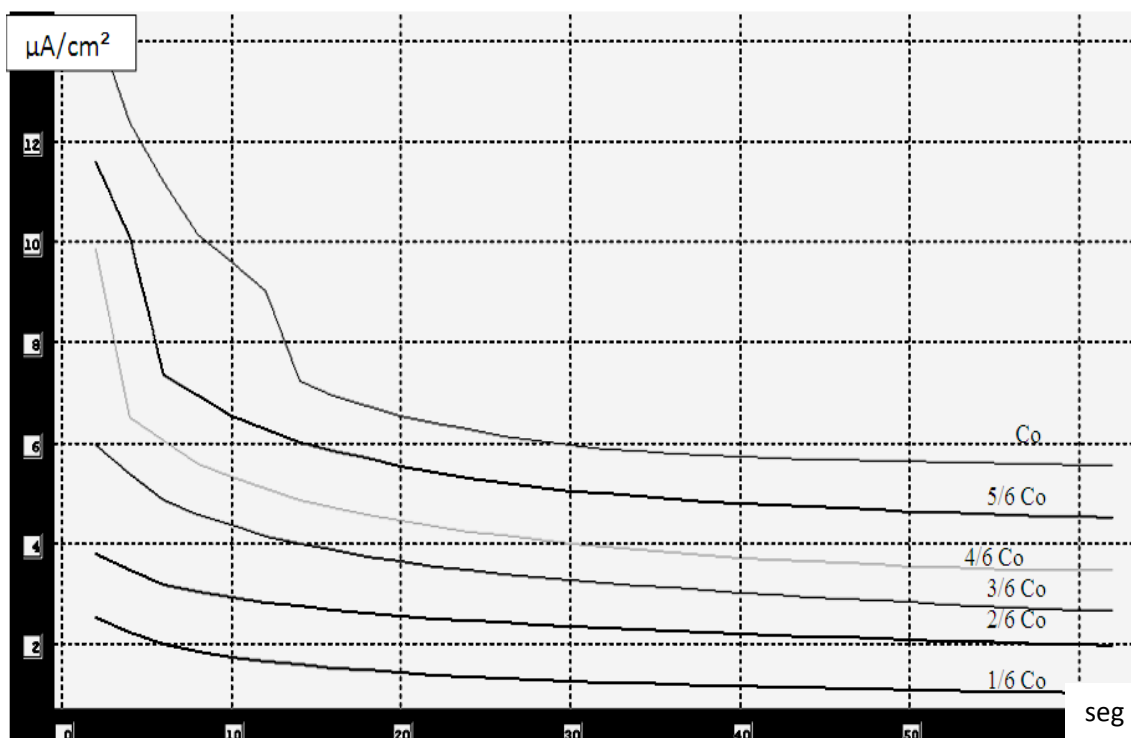


Figura 5.25. Cronoamperogramas obtenidos en la microcelda construida para 60  $\mu$ L de una disolución de  $K_4[Fe(CN)_6]$ , ( $Co=0.01$  M) en solución de fosfatos 0.5 M pH =7. ET=oro, ER=Ag(s)|AgCl(s)|NaNO<sub>3</sub>(0.1M), "1 compartimento" y el EA=Acero inoxidable en contacto directo con la solución. Se fijó un potencial de 170mV durante 60 segundos.

<sup>4</sup> Se empleó un Potenciostato/ Galvanostato PGP201 Radiometer (Holanda) para fijar el potencial.



Una vez que se tiene los voltamperogramas (Figura 5.25) se midió la corriente residual con respecto a la concentración de  $K_4[Fe(CN)_6]$  se construyó la curva de calibración mostrada en la Figura 5.26.

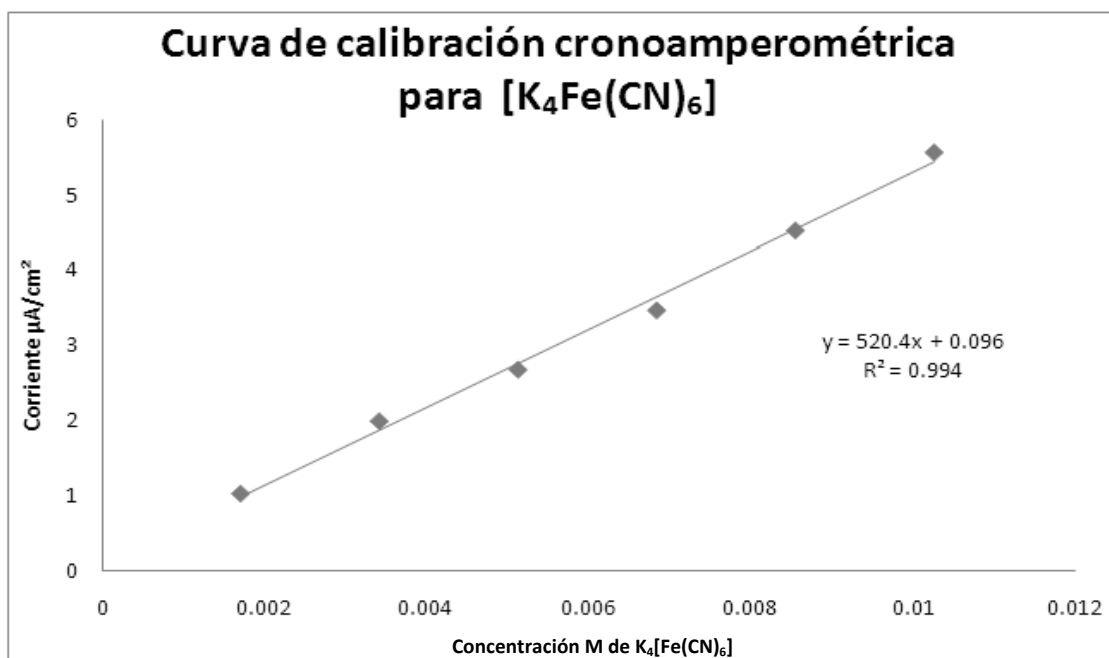


Figura 5.26, Curva de calibración cronamperométrica (cronogramas previos Fig. 5.27) obtenida a partir de la corriente residual después de aplicar un potencial de 170 mV durante 60 segundos.

Repitiendo el mismo procedimiento y modificando el número de compartimentos según la Tabla 5.1 se construyeron las curvas de calibración de la Figura (5.29).

Tabla 5.1. Diferentes números de compartimentos para el electrodo de trabajo y referencial empleados para efectuar la curva de calibración cronamperométrica para  $K_4[Fe(CN)_6]$ .

Número de compartimentos EA	Número de compartimentos ER	Pendiente de la curva de calibración (Figura 5.17)
3	3	114.8
2	3	277.8
2	2	366.4
1	2	395.1
0	1	520.4

En la Tabla 5.1 se puede apreciar que al incrementar el número de compartimentos se incrementa la resistencia del sistema. Lo cual se aprecia de forma cuantitativa en la reducción del valor de la pendiente. (EA= electrodo auxiliar y ER=electrodo de referencia).

En los voltamperogramas obtenidos se ve una tendencia lineal entre la concentración de  $K_4[Fe(CN)_6]$  y la corriente residual medida a los 60 segundos. Todas las curvas de calibración (Figura 5.27) poseen coeficientes de correlación cercanos a la unidad: 0.996, 0.994, 0.989, 0.981 y 0.908.

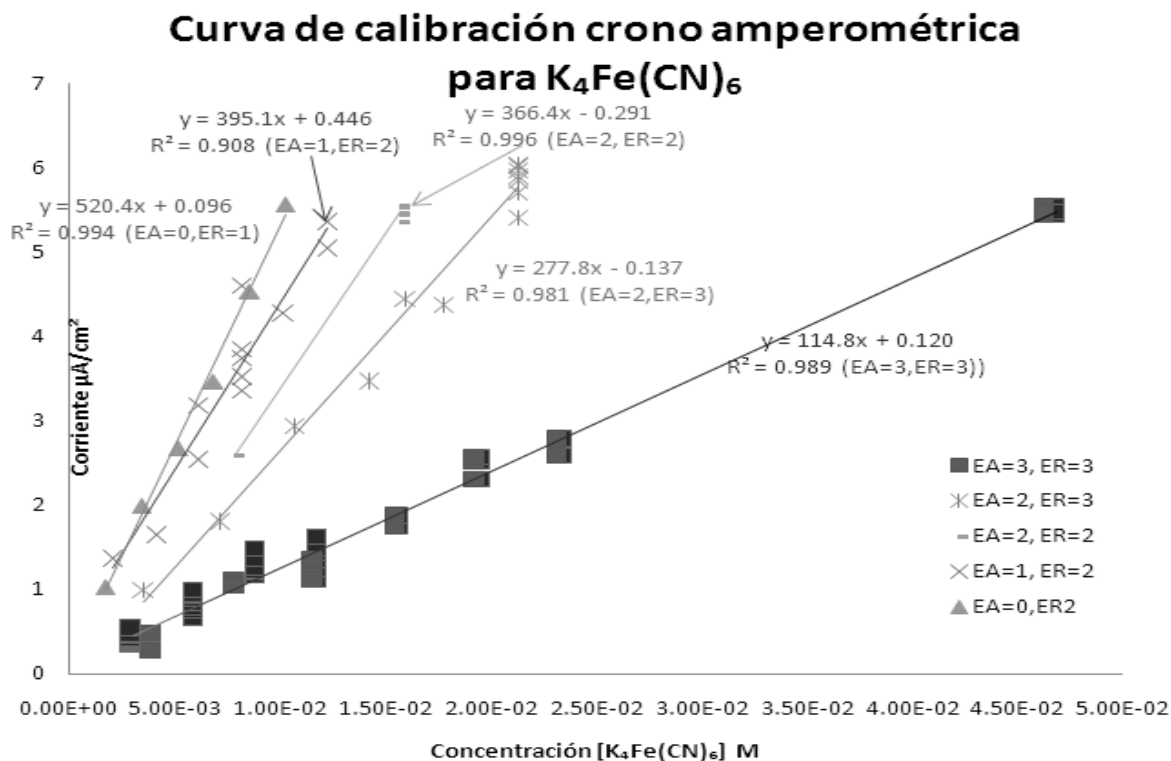


Figura 5.27, Curvas de calibración cronoamperométrica,  $I_r=60s = f(C)$  para soluciones estándar de  $K_4Fe(CN)_6$  en fosfatos 0.5 M pH =7 y para las cuales se emplearon un número diferente de compartimentos para el electrodo de referencia y para el electrodo auxiliar. Se indica en el mismo el número de éstos para el electro auxiliar, EA, y para el de referencia, ER.

Mientras que en la Tabla 5.1 se puede ver que se incrementa la tensión en el sistema conforme se incrementa el número de compartimentos. Y de forma cuantitativa en la disminución del valor de la pendiente. Y se puede ver el efecto de compartimentalizar el electrodo auxiliar es superior a el efecto de compartimentalizar el electrodo de referencia. Esto es correcto debido a que es mayor la corriente que circular por el electrodo auxiliar.

En la Figura 5.27 se puede apreciar que:

- A) El sistema cuando se usan 2 compartimentos para el electrodo auxiliar y dos compartimentos para el electrodo de referencia se obtienen los mejores resultados debido a que el coeficiente de correlación lineal es más elevado.
- B) Cuando se usan 3 compartimentos para ambos electrodos se obtiene un rango más amplio para la cuantificación.
- C) Y al emplear solo dos compartimentos en el electrodo auxiliar se incrementa la sensibilidad del sistema casi cinco veces más que cuando existen varios compartimentos (esto se aprecia en la pendiente que va de 520.4 A 114.8).
- D) El efecto de colocar varios compartimentos en el electrodo auxiliar es mas significativo que en el electrodo de referencia. Motivo por el cual en el siguiente experimento solo se colocan varios compartimentos en el electrodo auxiliar.

### ***5.4 Cuantificación de glucosa.***

Una vez construidas las curva de calibración cronopotenciométricas para el  $K_4[Fe(CN)_6]$ . Se adicionaron a un pocillo 40  $\mu$ L de la concentración 0.01 M de  $K_4[Fe(CN)_6]$  mas 10  $\mu$ L de glucosa de diluciones estándar de concentración creciente (90, 100, 110, 120 mg/dL) y 10  $\mu$ L de glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* 1029 unidades /mL. Se mezcló con una micropipeta. Un minuto después se depositó en la microcelda.

Los resultados aparecen En la Figura 5.28 y se puede apreciar como decrece la concentración de  $K_4[Fe(CN)_6]$ , debido a la producción *in situ* de peróxido de hidró-

geno. Por la presencia de la enzima (GOD) y de su sustrato (glucosa). En la misma Figura se corrobora que la resistencia se incrementa conforme se incrementan las compartimentalizaciones del electrodo auxiliar.

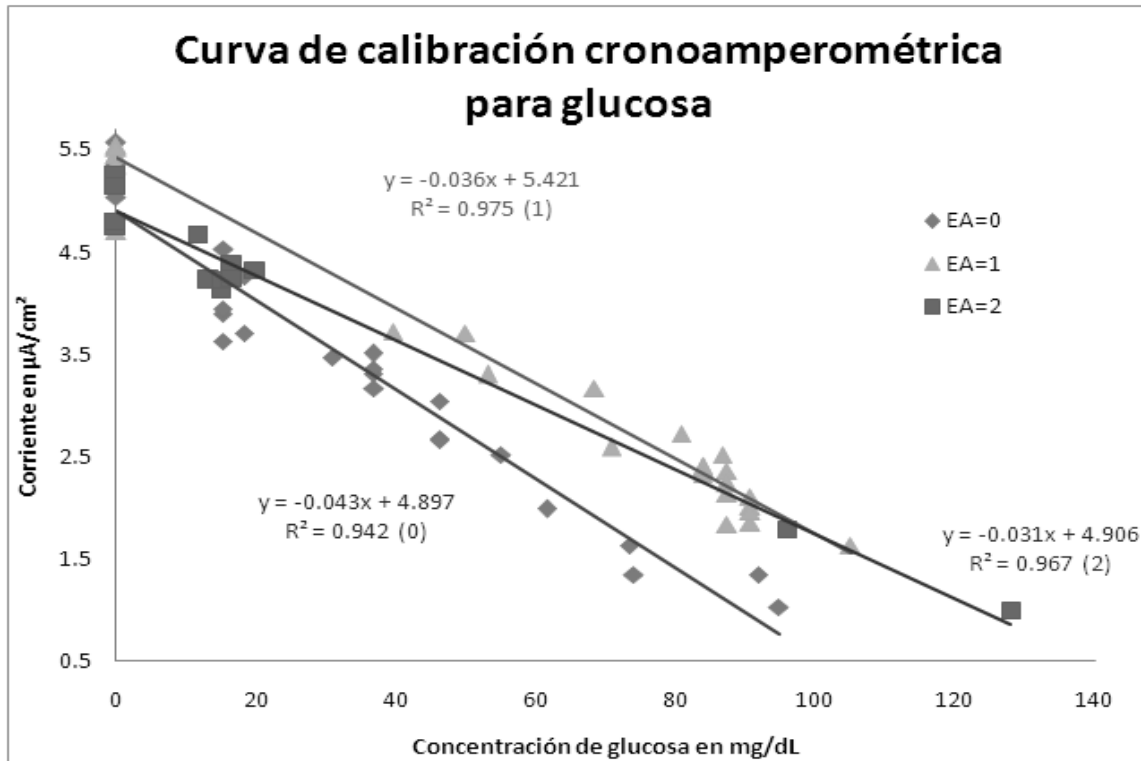


Figura 5.28, Curva de calibración cronamperométrica para la concentración de glucosa en la microcelda. El electrodo de referencia se compartimentalizó 2 veces en todos los experimentos. El electrodo de auxiliar no compartimentalizó en (0), se compartimentalizó una vez en (1) y dos veces en (2). Se puede apreciar que a mayor número de compartimentos hay más resistencia.

La Figura 5.28 nos indica que se puede cuantificar glucosa en intervalo de (15 a 200  $\text{mg}/\text{dL}$ ) en la microcelda construida empleando un diferente número de compartimentos para el electrodo auxiliar.

Debido a problemas con la reproducibilidad de los datos se abrió más el intervalo de la concentración de glucosa añadida, y se adicionaron valores entre 15 y 200  $\text{mg}/\text{dL}$ . Para efectuar los cronopotenciogramas el electrodo auxiliar se compartimentalizó diferentes veces (2 y 1) y en el último caso se puso en contacto directo

con la muestra. En la Figura 5.28 se muestra que la resistencia se incrementa conforme se incrementan las compartimentalizaciones.

Se puede concluir a partir de la Figura 5.28 que:

- A) Cuando se compartimentaliza dos veces el electrodo de referencia se obtiene un rango mas amplio para la cuantificación de glucosa.
- B) La resistencia se incrementa con el número de compartimentos diferentes empleados.
- C) Cuando se puso el electrodo auxiliar en contacto directo con la muestra se incremento la sensibilidad del sistema.

### ***5.4.1 Cuantificación de glucosa en una muestra de sangre.***

Una vez construidas las curvas de calibración cronopotenciométricas para la glucosa, se trabajó con dos compartimentos (para ambos electrodos) para ejecutar el análisis de glucosa en sangre total.

Se adicionaron a un pocillo 40  $\mu\text{L}$  de la concentración 0.01 M de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . Con una lanceta se puncionó el dedo índice se presionó el dedo y con una micropipeta se tomaron 10  $\mu\text{L}$  sangre y 10  $\mu\text{L}$  de glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* 1029 unidades /mL. Se mezcló con una micropipeta. Un minuto después se depositó en la microcelda.

Se aplicó un potencial de 170mV durante 60 segundos y después de ese tiempo. Se midió el valor de la corriente. Y los valores de corriente encontrados son interpolado en la curva de calibración para determinar la concentración de glucosa en las muestras de sangre analizadas.

Los resultados de las muestras de sangre analizadas se muestran en la Tabla 5.2

Tabla 5.2.Comparación entra la concentración de glucosa y las horas sin ingesta de alimentos.

Horas in ingesta de alimentos	Concentración de glucosa (mg/dL)
Menos de una hora	115.23
Menos de una hora	107.12
Mas de 8 horas	70.45
Mas de 8 horas	60.82

En la Tabla 5.2 se puede apreciar que los voluntarios que habían ingerido alimentos recientemente tienen valores más altos de glucosa y los que estuvieron más tiempo en ayunas presentan valores más bajos de glucosa.

## VI Conclusiones.

### **Conclusiones.**

Se logro apreciar el efecto del material del electrodo de trabajo sobre la cuantificación de peróxido de hidrógeno.

Se logro apreciar la adsorción de los fosfatos sobre el electrodo de oro.

Se encontraron las condiciones experimentales para cuantificar peróxido de hidrógeno.

Se logro elaborar una microcelda con elementos de bajo costo y fácil construcción.

Y los resultados parecen indicar que el diseño de la misma es adecuado para efectuar la cuantificación de glucosa en muestras de sangre.

En la presente tesis se logro estudiar el sistema acoplado ferricianuro-glucosa mediado por la enzima glucosa oxidasa. A partir de este sistema y en condiciones de miniaturización empleando elementos de bajo costo, se logro obtener una respuesta lineal que proporcional a la concentración de glucosa. Esta respuesta se ajusta bien a una línea recta. Esto último soportado por el elevado coeficiente de correlación lineal.

Parte de los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron enviados a la 19 Conferencia de Química Santiago de Cuba 2008.



Parte de los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron aceptados y serán presentados en la 19 Conferencia de Química Santiago de Cuba 2008.

Se logró medir concentraciones de glucosa en muestras de sangre y se obtienen valores congruentes con la información de los voluntarios.

Por lo tanto estos estudios podrían ser empleados para la construcción de un prototipo de glucómetro digital.

### **Retos**

Se pretende que continúen los estudios efectuados con esta microcelda y este sistema acoplado.

Se perfeccione la metodología para tomar la sangre.

Se conecte a un equipo de mínima instrumentación MIMP (Minimal instrumentación Micro Polarograph) y se incremente el número de experimentos con muestras de sangre para poder tener un equipo comercial desarrollado por el Laboratorio de Electroquímica Analítica de la Facultad de Química.

## VII Referencias.

## Referencias

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. Asunción A. Campo J. "Preliminary Contribution to the Quantification of HMF in Honey by Electrochemical Biosensor Chips", *Electroanalysis* 18/2435-2440 (2006).
3. Baeza A., "Electroquímica de sistemas", Documentos de Apoyo para Química Analítica Instrumental I, UNAM, México, 2004.  
<http://mx.geocities.com/electroquimika>
4. Baeza A, "Sensores y Biosensores", Documentos de Apoyo para Química Analítica Instrumental I, UNAM, México, 2004. <http://mx.geocities.com/electroquimika>.
5. Baeza A, Ortiz J., "Principios de electroquímica", Documentos de Apoyo para Química Analítica Instrumental I, UNAM, México, 2004.  
<http://mx.geocities.com/electroquimika>
6. Borja E., Determinación del pH en acetonitrilo con microelectrodos miniaturizados a base de polímero conductor, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 2002.
7. Bott A. "Electrochemical Methods for determination of glucose", *current Separations* 17/1:25-30 (1998).
8. Cruz N., Diseño y construcción de prototipos de sistemas microbiosensores electroquímicos selectivos a peróxido de hidrogeno, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 2001.
9. 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.
10. Díaz P., Construcción de un microsensor a  $H^+$  (no membranal) para determinar potenciométricamente el pH, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 2001.

11. Díaz P., Determinación de peróxido de hidrogeno en muestras clínicas, Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México, 2004.
12. Espinoza V., Akhtav M., Baeza A, et al, "Effect of incubation period on phosphate sorbtion from three P sources in Morelos soil", *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7 ccc, 2004.
13. E. Galicia, E. Rangel, A. Baeza, "Estudio voltamperométrico del sistema del yodo a pH impuesto en microceldas electroanalíticas de bajo costo" XXXVIII Congreso Mexicano de Química.(2003)
14. H. L. Kies. "Polarography controlled density or chronopotentiometry whit current density sweep at dropping mercury electrode", *J. Electroanal. Chem*, 16/279-281 (1968).
15. Harris D., *Análisis Químico Cuantitativo*, 2ª edición, editorial Reverté, Barcelona. 2001.
16. García G., Construcción de un biosensor selectivo a urea con base en un transductor dePOSAI, Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México, 1997.
17. Kaplan L., Pesce A. J., *Química Clínica Técnicas de Laboratorio-Fisiopatología-Métodos de Análisis*, Editorial Panamericana, Argentina, 1992.
18. L. Hang W. Ewing. "Chronopotentiometry with Programmed Current", *Analytical Chemistry* 51/322-327 (1979)
19. Lenhinger A., *Bioquímica Las bases moleculares de la estructura y Junción celular*, 2a Ed., Ediciones Omega S.A, Barcelona, 1994.
20. Morales A., Construcción y evaluación de biosensores amperométricos basados en biocomposites, Tesis de Doctorado, UAB, España, 1996.
21. 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.

22. Lafleur R., Myland J., Oldham K., "Analytical microelectrode voltammetry with minimal instrumentation", *Electroanalysis*, Vol. 2,1990, pp 223-228.
23. Stryer L. Berg J. Tymoczko., *Bioquímica*, 5<sup>ta</sup> edición, editorial Reverté, Buenos Aires. 2003.
24. 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.
25. Voet D., *Bioquímica*, Ediciones Omega S.A., Barcelona, 1992.
26. <http://www.who.int/diabetes/en/> visitada el 02/02/2009
27. Wiley David K. Gosser, *Cyclic Voltammetry, "Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms"*.
28. Z.J.R. Casanova Moreno, J.A. Baeza Reyes "Estudio integral del cloro en desinfectantes hospitalarios" *Revista Cubana de Química*, XVII,/1/, 43-51 (2005).

---

# MICROELECTRO ANÁLISIS DE BAJO COSTO CRONOAMPEROMÉTRICO Y VOLTAMPEROMÉTRICO DEL SISTEMA ACOPLADO FERRICIANURO-GLUCOSA MEDIADO POR GLUCOSA OXIDASA.

Guillermo H. Alvarez Arizabalo, Alejandro Baeza

Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Univeritaria, Facultad de química,  
Electroquímica Analítica

[free\\_wuilly@yahoo.com](mailto:free_wuilly@yahoo.com), [baeza@servidor.unam.mx](mailto:baeza@servidor.unam.mx)

Palabras clave: microcelda electroquímica, bajo costo, detección de glucosa, glucosa oxidasa (GOD), voltamperometría, cronoamperometría.

## Introducción

La organización mundial de la salud reporta que por lo menos 171 millones de personas en el mundo tienen diabetes y es probable que para el 2030 esta cantidad aumente a más del doble. En los países en vías de desarrollo el número de personas con diabetes aumentará un 150% en los próximos 25 años. Por lo que es importante ayudar a las personas con diabetes a obtener el conocimiento y las habilidades necesarias para manejar y controlar su condición.

En el mercado se encuentran equipos para la cuantificación de glucosa en sangre. El costo de una tira reactiva es de siete pesos mexicanos (0.5 euros). Si una persona después de comer verifica sus niveles de glucosa en sangre gastaría en tiras reactivas 45 euros al mes (tomando en cuenta tres comidas al día durante un mes) cifra que la mayoría de la población no puede pagar.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado instrumentación microanalítica y óptica que permite realizar determinaciones analíticas de diversa complejidad con calidad analítica<sup>(1-5)</sup> con materiales disponibles localmente y de bajo costo con la finalidad de manejar cantidades y volúmenes pequeños para minimizar costos y desechos.

En el presente trabajo corto se construyó una microcelda de bajo costo para cuantificar glucosa, de volumen fijo (50  $\mu\text{L}$ ) en soluciones estándar y muestras de sangre total obtenida por punción pulgar (10  $\mu\text{L}$ ) así como microelectrodos. Se muestra la importancia de la compartimentalización de los microelectrodos de referencia y trabajo para estos volúmenes a microescala electroanalítica

## Fundamentos.

La enzima mas usada para la detección de glucosa es la glucosa oxidasa (GOD). En esta reacción la glucosa es oxidada a ácido glucurónico y se produce peróxido de hidrógeno que oxida el hexacianoferrato (II) y éste último puede ser cuantificado por voltamperometría cíclica de barrido de corriente o de potencial y cronoamperometría usando microelectrodos de oro, platino o carbón<sup>(6)</sup>.

Metodología experimental.

### Construcción de la microcelda con elementos de bajo costo.

Para formar la microcelda se desgasto con una punta cilíndrica del microtaladro un pedazo de acrílico de  $1 \text{ cm}^2$  de área, acto seguido se efectuaron tres perforaciones de 1.8 mm a los costados con la microbroca para colocar los tres microelectrodos

#### Construcción de los microelectrodos

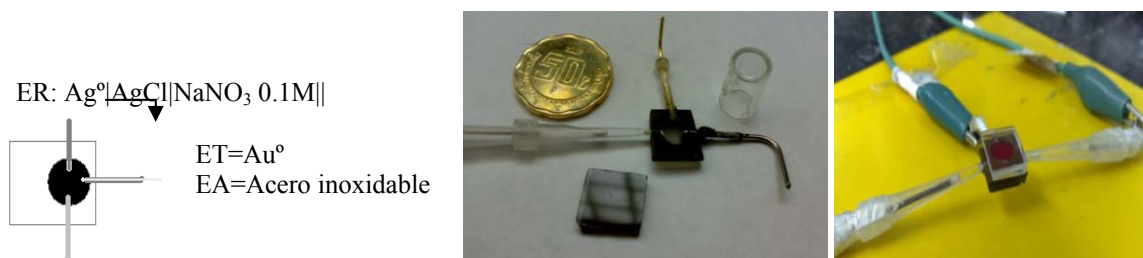
Para la construcción del electrodo de trabajo se corto un pedazo de alambre de oro de 1 mm de diámetro que se selló con cinta teflón en una de las perforaciones de la celda. En cada ensayo se pule el disco con alúmina de  $50 \mu\text{m}$ .

El electrodo de referencia es un alambre de plata recubierto con cloruro de plata por oxidación electroquímica en medio HCl 0.1M. El alambre de plata recubierto de AgCl se introdujo en una punta de micropipeta que contenía  $\text{NaNO}_3$  0.1 M y un extremo tapado con un algodón como membrana separadora y se selló por el otro extremo con cinta teflón. El microelectrodo de referencia se utilizó directamente en unos ensayos, en otros se conecta a la microcelda mediante compartimentos separadores.

El electrodo auxiliar es un microalambre de acero inoxidable pulido. El electrodo auxiliar se introduce en un compartimento separado.

Los compartimentos separadores son puntas de micropipeta llenas de  $\text{NaNO}_3$  0.1 M con un extremo sellado con algodón.

La figura 1 muestra las fotografías del arreglo electroquímico empleado.



**Figura 1. Diagrama y fotografía de la microcelda empleada para la cuantificación de glucosa, donde ER= electrodo de referencia, ET= electrodo de trabajo, EA= electrodo auxiliar.  $V_0 = 60 \mu\text{L}$ .**

Se seleccionaron tres metodologías electroanalíticas para la detección de la disminución del Fe(II) catalizada por GOD.

- Voltamperometría de barrido lineal de corriente.
- Voltamperometría de barrido triangular de potencial
- Cronoamperometría de pulso directo de potencial<sup>(7-9)</sup>.

Se utiliza un Potenciostato-Galvanostato PGP 201 Radiometer Copenhagen y el programa Voltmaster 1.

a) Se trazan los voltamperogramas de barrido triangular de corriente bajo el siguiente programa de perturbación:  $I_0 = -50 \mu\text{A}$ ,  $I_f = 70 \mu\text{A}$ ,  $v = 10 \text{ mA/min}$ . Medio de reacción amortiguador de Tris 0.1 M pH = 8.

Se efectuó un barrido de corriente para  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  0.1 M en usencia y en presencia de alícuotas crecientes de 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.01M hasta adicionar 1mL total. Se repite el mismo procedimiento para  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  y mezclas de los dos compuestos. En la Figura 2 se aprecia como disminuye la concentración de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  debido a las adiciones de peróxido de hidrógeno 0.01 M. La figura 3 nos muestra como crecen las concentraciones de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  y  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  debido a adiciones de la mezcla 0.1M de los mismos compuestos.

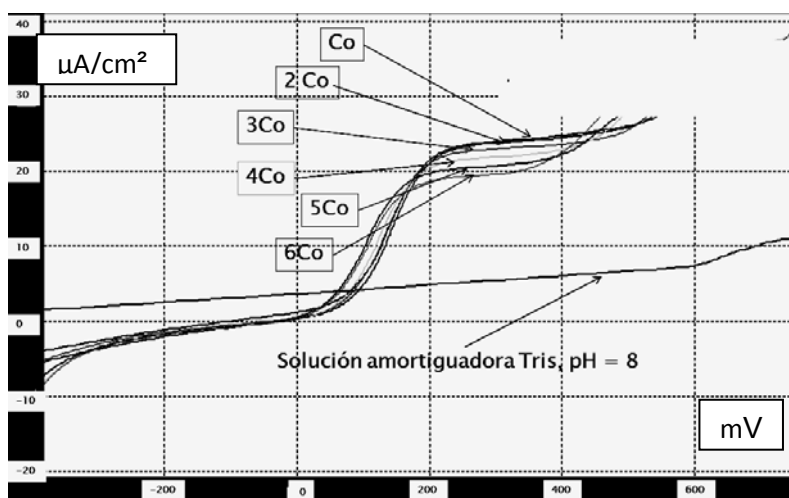


Figura 2, Fragmento de un voltamperograma de barrido triangular de corriente  $E=f(i)$  de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . ( $\text{Co} = 0.5\text{mM}$ ) en amortiguador de TRIS pH=8,  $\text{ET}=\text{Au}^\circ$ ,  $\text{ER}=\text{Ag}^\circ/\text{AgCl}$ ,  $\text{EA}=\text{Acero inoxidable}$ . Programa de perturbación:  $I_0=-50\mu\text{A}$ ,  $I_f=70\mu\text{A}$ ,  $v=10 \text{ mA/min}$ . Se indica sobre los voltamperogramas la concentración total adicionada de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

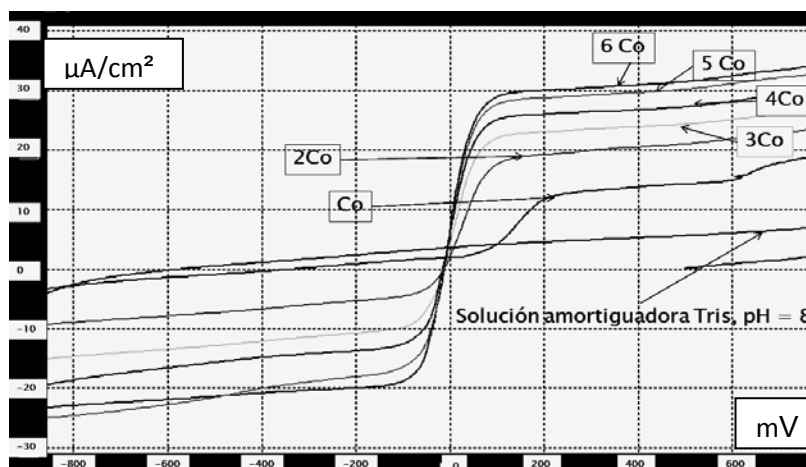


Figura 3. Voltamperograma de barrido triangular de corriente  $E=f(i)$ , de una mezcla de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  y  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$   $\text{Co} = 0.5\text{mM}$   $\text{ET}=\text{Au}^\circ$ ,  $\text{ER}=\text{Ag}^\circ/\text{AgCl}$ ,  $\text{EA}=\text{Acero inoxidable}$ . Programa de perturbación:  $I_0=-50\mu\text{A}$ ,  $I_f=70\mu\text{A}$ ,  $v=10 \text{ mA/min}$ .



b) Se trazan los voltamperogramas de barrido triangular de potencial bajo el siguiente programa de perturbación:  $E_o = -250$  mV,  $E_{inversión} = 410$  mV;  $v = 300$  mV/min.

Voltamperometría cíclica.

Los ensayos se realizan por adiciones de  $50\mu\text{L}$  de una solución *stock* o madre  $0.1\text{M}$  de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  para obtener sus respectivas diluciones 1/10, 2/10, 3/10, 4/10, 5/10, 6/10, 7/10, 8/10 y 9/10 en la microcelda. La figura 4 muestra los voltamperogramas obtenidos. Se puede apreciar un claro incremento proporcional en la corriente de pico anódico con respecto a la concentración de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  en la microcelda.

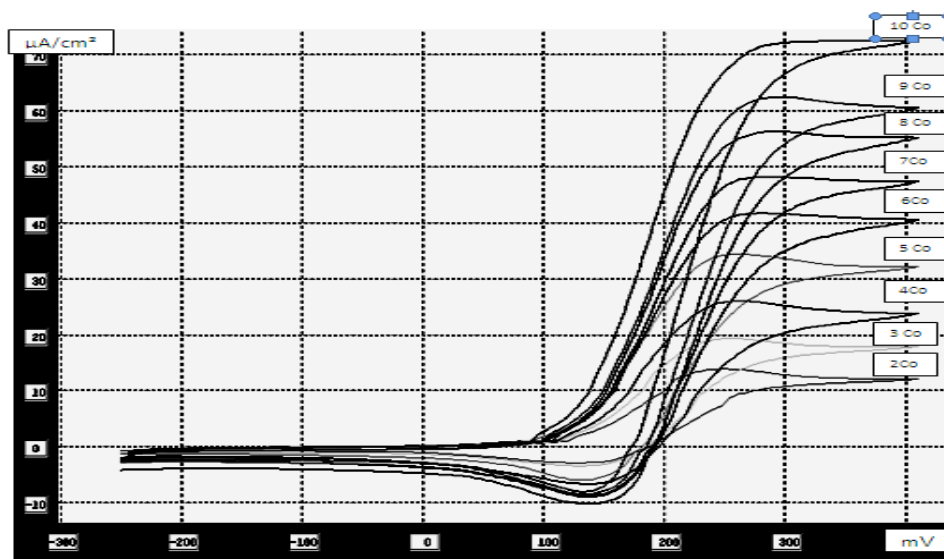


Figura 4 Voltamperogramas de  $0.1\text{M}$   $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $\text{Co} = 0.01\text{M}$ ) y sus respectivas diluciones 1/10, 2/10, 3/10, 4/10, 5/10, 6/10, 7/10, 8/10 y 9/10.  $\text{Co} = \text{ET}=\text{oro}$ ,  $\text{ER} = \text{Ag}^0/\text{AgCl}$ ,  $\text{EA} = \text{Acero inoxidable}$ ,  $E_o = -250$  mV,  $E_{inversión} = 410$  mV;  $v = 300$  mV/min.

Verificado que la celda puede cuantificar  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , se procedió a repetir el ensayo para concentraciones 20 veces más bajas debido a que el valor de concentración de glucosa en una persona normal antes de las comidas corresponde a  $60\text{-}120$  mg/dL, que corresponden al intervalo de  $(3.33 - 6.11)\text{mM}$ . Para hacer los voltamperogramas se adicionaron  $50\mu\text{L}$  a la microcelda de las concentraciones  $0.02\text{M}$  y diluciones 1:6. Se aplica el mismo programa de perturbación:  $E_o = -250$  mV,  $E_{inversión} = 410$  mV;  $v = 300$  mV/min. Tanto el microelectrodo de referencia como el microauxiliar se compartimentalizan doblemente.

La figura 5 muestra los voltamperogramas obtenidos. Al igual que en las soluciones concentradas se puede apreciar un claro incremento proporcional en la corriente de pico anódico con respecto a la  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ .

Los valores de corriente de pico anódico aunados a los datos de concentración de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  fueron empleados para efectuar las respectivas curvas de calibración que se muestra en la figura 6. Se puede apreciar una clara tendencia lineal y un coeficiente de correlación lineal adecuado para este tipo de electroanálisis,  $r^2 = 0.9690$ .

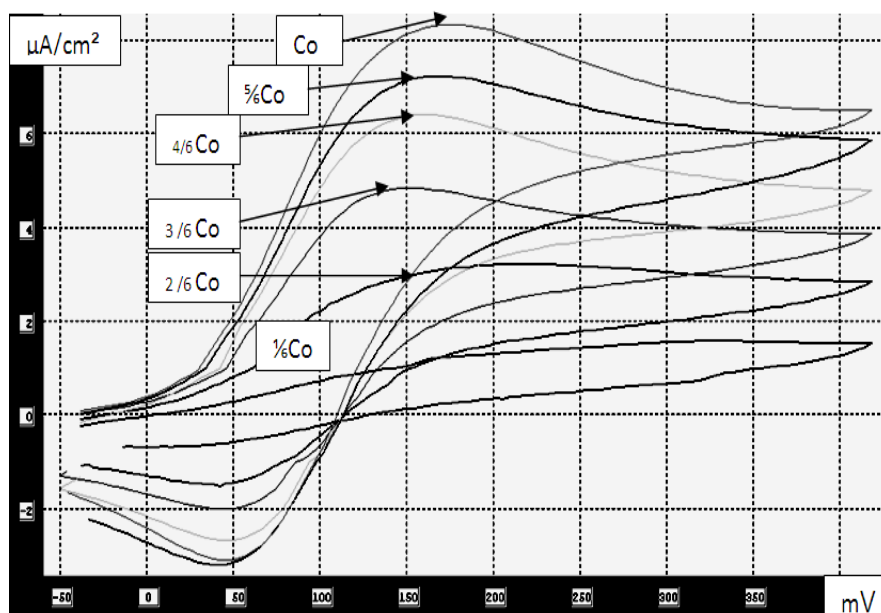


Figura 5, Voltamperogramas obtenidos en la microcelda construida,  $V = 60\mu\text{L}$  para  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $\text{Co}=0.01\text{ M}$ ) y sus respectivas diluciones 1:6, 2:6, 3:6, 4:6, 5:6. ET=oro, ER=  $\text{Ag}(\text{s})|\text{AgCl}(\text{s})|\text{NaNO}_3(0.1\text{M})|\text{NaNO}_3\ 0.1\text{M}||$  EA=Acero inoxidable.  $E_o = -250\text{ mV}$ ,  $E_{\text{inversión}} = 410\text{ mV}$ ;  $v = 300\text{ mV/min}$ .

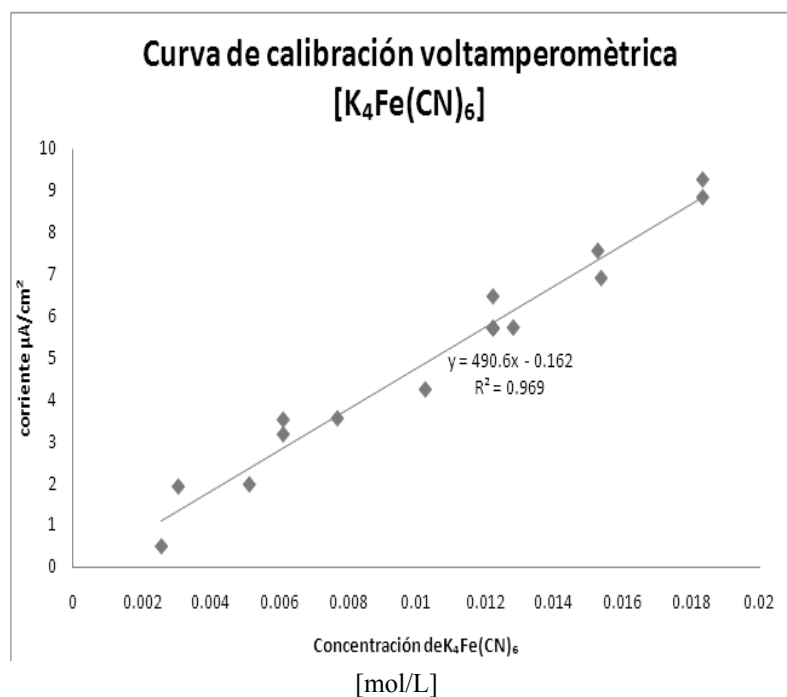
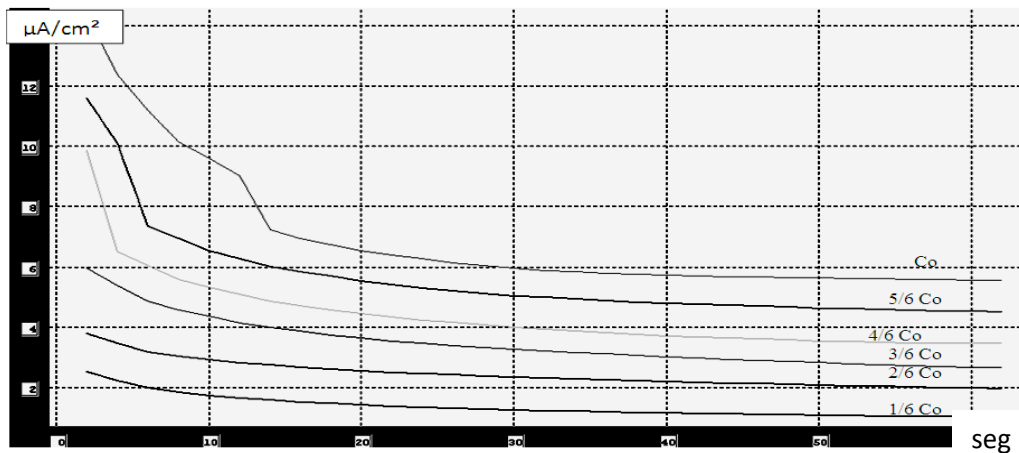


Figura 6., Curva de calibración voltamperométrica obtenida a partir de la corriente de pico anódico y las respectivas concentraciones de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  estándar adicionado a la microcelda construida. Empleando dos compartimentos para el electrodo de referencia y el electrodo auxiliar en contacto con la solución.

c) Se trazan los cronoamperogramas de pulso directo de potencial,  $I = f(t)$ .

Cronoamperometría de pulso directo.

Adicionalmente se realizó este estudio para poder apreciar el efecto del compartimento separador. Para ello se realizaron cinco curvas de calibración cronoamperométricas empleando diferente número de compartimentos para el electrodo de referencia y para el auxiliar. Para cada ensayo se adaptó al electrodo auxiliar y referencia un número de compartimentos variable. Se fijó el potencial de pico anódico (170mV) durante 60 segundos para obtener los cronoamperogramas de disoluciones estándar de  $K_4[Fe(CN)_6]$ . La figura 7 muestra los cronoamperogramas obtenidos.



**Figura 7, Cronoamperogramas obtenidos en la microcelda construida para 50  $\mu$ L de una disolución de  $K_4[Fe(CN)_6]$ , ( $Co=0.01$  M) y sus respectivas diluciones 1/6, 2/6, 3/6, 4/6, 5/6,. ET=oro, ER=Ag(s)|AgCl(s)|NaNO<sub>3</sub>(0.1M),“1 compartimento” y el EA=Acero inoxidable en contacto directo con la solución. Se fijó un potencial de 170mV durante 60 segundos.**

La figura 8 muestra la curva de calibración cronoamperométrica para  $E_{imp} = 170$  mV y un tiempo de muestreo de  $\tau = 60$  s una vez restada la corriente residual para los experimentos correspondientes a la figura 7 (compartimentalización del ER) ..

Repetiendo el mismo procedimiento y modificando el número de compartimentos según la Tabla 2 se construyeron las curvas de calibración de la Figura 9.

**Tabla 2. Diferentes números de compartimentos para el electrodo de trabajo y referencial empleados para efectuar la curva de calibración cronoamperométrica para  $K_4[Fe(CN)_6]$ .**

Número de compartimentos para EA	Número de compartimentos para ER	Pendiente de la curva de calibración (Figura 8)
3	3	114.8
2	3	277.8
2	2	366.4
1	2	395.1
0	1	520.4

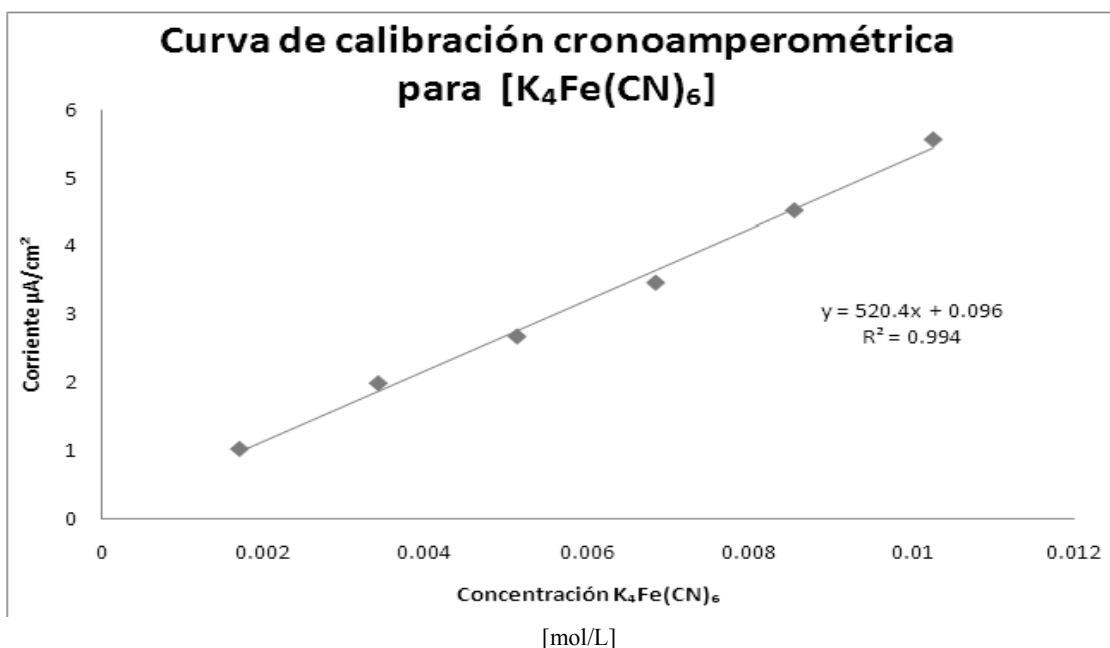


Figura 8. Curva de calibración cronoamperométrica,  $I_t = f(C)$  para soluciones estándar de  $K_4[Fe(CN)_6]$  después de aplicar un potencial de 170 mV para un tiempo de muestreo  $\tau = 60$  s. Electrodo de referencia compartimentalizado.

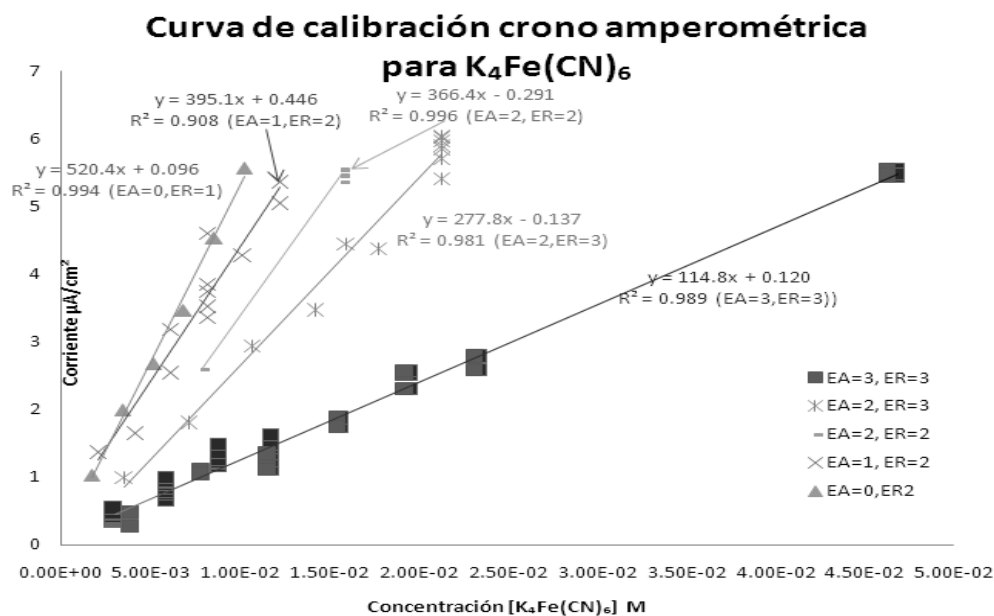


Figura 9. Curva de calibración cronoamperométrica,  $I_{\tau=60s} = f(C)$  para soluciones estándar de  $K_4Fe(CN)_6$  en las cuales se emplearon un número diferente de compartimentos para el electrodo de referencia y para el electrodo auxiliar.

## Microcuantificación de Glucosa.

Una vez construidas las curva de calibración cronopotenciométricas para el  $K_4[Fe(CN)_6]$ . Se adicionaron a un pocillo 40  $\mu\text{L}$  de la concentración 0.01 M de  $K_4[Fe(CN)_6]$  más 10  $\mu\text{L}$  de glucosa y 10  $\mu\text{L}$  de glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* 1029 unidades /mL. Se mezcló con una micropipeta. Un minuto después se depositó en la microcelda y se determinó la corriente cronoamperométrica a  $E = 170 \text{ mV}$  para un  $\tau = 60 \text{ s}$ . Se ensayaron diferentes concentraciones de glucosa estándar, 90, 100, 110, 120 mg/dL.

En la figura10 se puede ver como decrece la concentración de  $K_4[Fe(CN)_6]$ , debido a la producción *in situ* de peróxido de hidrógeno. Este último por la presencia de la enzima (GOD) y de su sustrato (glucosa).

Debido a problemas con la reproducibilidad de los datos se abrió más el intervalo de la concentración de glucosa añadida, y se adicionaron valores entre 15 y 200 mg/dL. Para efectuar los cronopotenciogramas el electrodo auxiliar se compartamentalizó diferentes veces (2 y 1) y en el último caso se puso en contacto directo con la muestra. En la misma figura 10 se puede apreciar que la resistencia se incrementa conforme se incrementan las compartamentalizaciones.

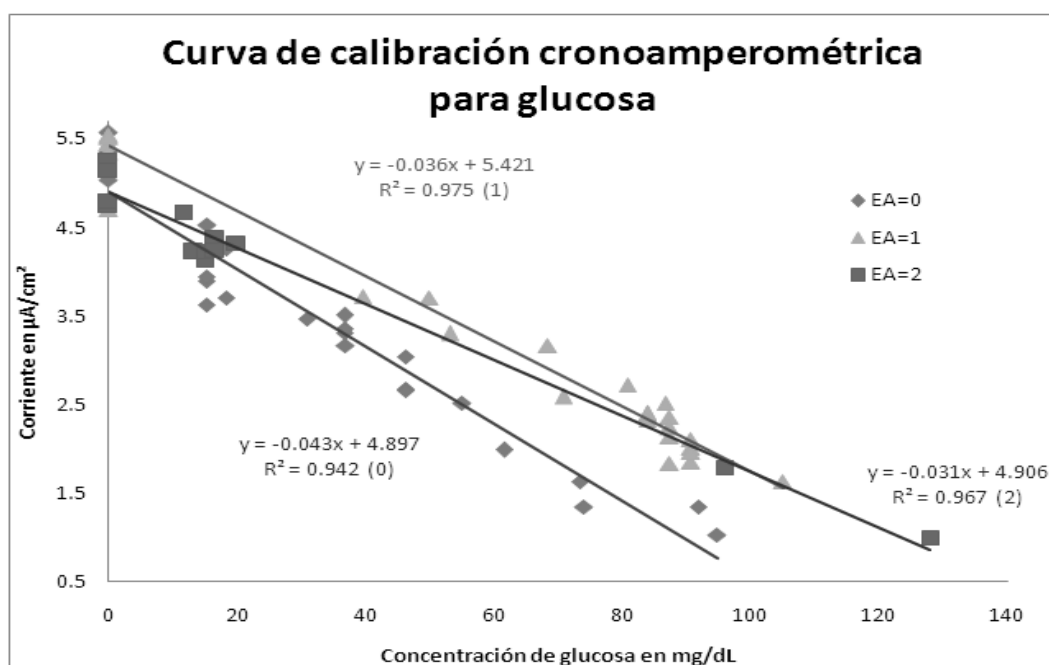


Figura 10. Curva de calibración cronopotenciométrica,  $I_{(E=170\text{mV}, \tau=60\text{s})} = f(C)$  para la determinación de glucosa estándar en la microcelda. El electrodo de referencia se compartamentalizó 2 veces en todos los experimentos. El electrodo de auxiliar no compartamentalizó en (0), se compartamentalizó una vez en (1) y dos veces en (2).

### Microcuantificación de glucosa en una muestra de sangre.

Con la finalidad de evaluar el comportamiento cronoamperométrico de la microcelda propuesta en presencia de muestras reales de sangre total se realizaron ensayos cronoamperométricos compartimentalizando doblemente el microelectrodo de referencia y el microelectrodo auxiliar.

Se mezclan en un pocillo 40  $\mu\text{L}$  de la concentración 0.01 M de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  y 10  $\mu\text{L}$  sangre obtenida por punción pulgar. Se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* 1029 unidades /mL. Se mezcló con una micropipeta. Un minuto después se depositó en la microcelda. Se aplicó un potencial de 170mV durante 60 segundos después de ese tiempo, se midió el valor de la corriente residual. Y con la curva de calibración se interpolaron esos valores de corriente para determinar la concentración de glucosa en sangre total.

De los cuatro voluntarios dos habían ingerido alimentos recientemente y dos tenían mas de 8 horas de sin haber ingerido alimentos. La información es consistente debido a que los voluntarios con mayor tiempo de ayunas presentaron valores mas bajos de glucosa. Los resultados preliminares se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3.Comparación entra la concentración de glucosa y las horas sin ingesta de alimentos.**

Horas in ingesta de alimentos	Concentración de glucosa (mg/dL)
Menos de una hora	115.23
Menos de una hora	107.12
Mas de 8 horas	70.45
Mas de 8 horas	60.82

### Conclusiones.

Se logró estudiar el sistema acoplado ferricianuro-glucosa mediado por la enzima glucosa oxidasa. A partir de este sistema en condiciones de miniaturización y con elementos de bajo costo se logró obtener una respuesta lineal y proporcional a la concentración de glucosa con un buen coeficiente de correlación lineal. Se recomienda efectuar una curva de calibración todos los días antes de efectuar el experimento.

Se logró medir concentraciones de glucosa en muestras de sangre total y se obtienen valores congruentes con la información de los voluntarios.

Los resultados obtenidos serán utilizados para realizar las determinaciones con la microcelda de bajo costo acoplada al Minipolarografo de Mínima Instrumentación, MIMP<sup>(10)</sup>, para construir un prototipo de un glucómetro digital de bajo costo para posteriores estudios de Desarrollo Analítico formal.

---

## Bibliografía

1. Akhtar M., Espinosa V., Baeza R. José, Mujeeb A., "Silvestris pH decreases and the use of W° microsensor to measure the site-specific change", *Pakistan Journal Of Soil Science*, 22, /2/, 41-46, (2003).
2. Prado Heriberto, Díaz Patricia, Ortíz José, Baeza R. José, "Polarographic determination of Km and Vmax of Glutathione Reductase", *Current Separations*, **20:4**, 117-120(2004).
3. Martínez N. Juan, Baeza R. José, "Química Microanalítica: Determinación de ácido acetilsalicílico con Microfotocolorímetros de Mínima Instrumentación (MIMC) de bajo costo", *Revista Cubana de Química*, 16, /3/, 29-39, (2004).
4. Baeza R. José, De Santiago Z. Adrián, "Química Analítica a Microescala Total", *Revista Cubana de Química*, XIX, /1/, 1126-1129, (2007).
5. C. Cosío, G. Tavizón, A. Baeza, P. de la Mora and R. Escudero "Structure and magnetic properties of the weak ferromagnet  $Sr_{2-x}La_xIrO_4$ ", *J. Phys.: Condens. Matter* **19**446210(13pp). (2007).
6. Bott A. "Electrochemical Methods for determination of glucose", *Current Separations* **17**/1:25-30 (1998).
7. Asunción A. Campo J. "Preliminary Contribution to the Quantification of HMF in Honey by Electrochemical Biosensor Chips", *Electroanalysis* **18**/2435-2440 (2006).
8. H. L. Kies. "Polarography controlled density or chronopotentiometry with current density sweep at dropping mercury electrode", *J. Electroanal. Chem*, **16**/279-281 (1968).
9. L. Hang W. Ewing. "Chronopotentiometry with Programmed Current", *Analytical Chemistry* **51**/322-327 (1979).
10. J.R. Casanova Moreno, J.A. Baeza Reyes "Estudio integral del cloro en desinfectantes hospitalarios" *Revista Cubana de Química*, XVII, /1/, 43-51 (2005).



## 19 CONFERENCIA DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

UNIVERSIDAD DE ORIENTE

Santiago de Cuba, 20 de agosto 2008

Guillermo H. Alvarez-Arizabal  
Facultad de Química, UNAM.  
México

Nos es grato comunicarle que la Comisión Técnica de la 19 Conferencia de Química aceptó el siguiente trabajo enviado por usted para su presentación:

**MICROELECTRO ANÁLISIS POR ESTUDIO CRONO AMPEROMÉTRICO Y  
VOLTAMPEROMÉTRICO DEL SISTEMA ACOPLADO FERRICIANURO-  
GLUCOSA MEDIADO POR GLUCOSA OXIDASA.**

Guillermo H. Alvarez-Arizabal . Alejandro Baeza

Posteriormente le comunicaremos el día y la forma de presentación de mismo.  
Agradecemos su participación y esperamos saludarle personalmente en Santiago de Cuba.

Atentamente

Dr. Maritza Cuatrecasas

Secretaria Ejecutiva

de la Conferencia de Química

Universidad de Oriente

Santiago de Cuba, Cuba

mpg@uor.edu.cu