

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, baeza@servidor.unam.mx

Palabras clave: microceldaelectroquímica, 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⁽¹⁻⁵⁾ 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 μ L) en soluciones estándar y muestras de sangre total obtenida por punción pulgar (10 μ 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⁽⁶⁾.

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 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 $50\text{ }\mu\text{m}$.

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 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 NaNO_3 0.1 M con un extremo sellado con algodón.

La figura 1 muestra las fotografías del arreglo electroquímico empleado.

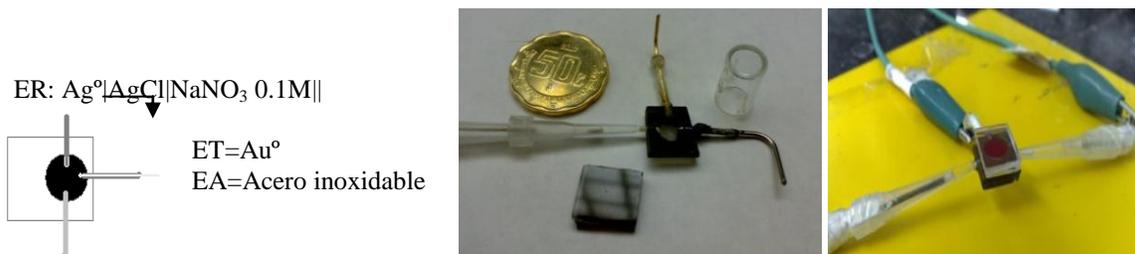


Figura 1. Diagrama y fotografía de la microcelda empleada para la cuantificación de glucosa, donde ER= electrodo de referencia, ET= electrodo de trabajo, EA= electrodo auxiliar. $V_0 = 60\text{ }\mu\text{L}$.

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⁽⁷⁻⁹⁾.

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 μL de H_2O_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.

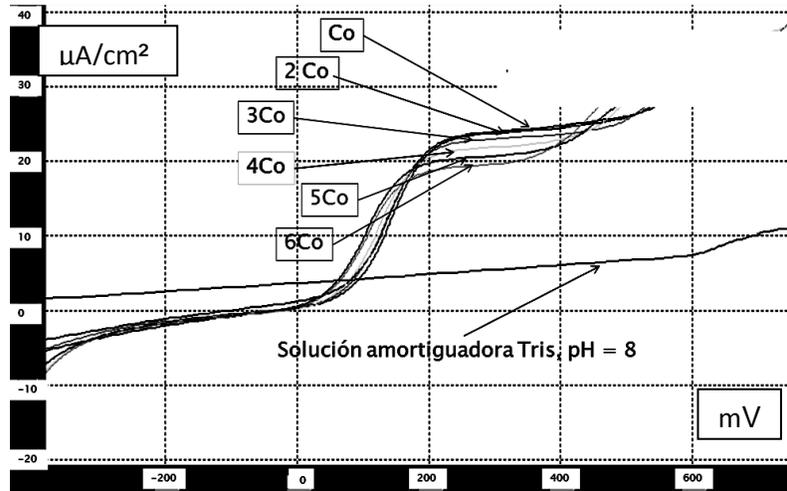


Figura 2, Fragmento de un voltamperograma de barrido triangular de corriente $E=f(i)$ de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. ($\text{Co} = 0.5\text{mM}$) en amortiguador de TRIS pH=8, $\text{ET}=\text{Au}^0$, $\text{ER}=\text{Ag}^0/\text{AgCl}$, $\text{EA}=\text{Acero inoxidable}$. Programa de perturbación: $I_0=-50\mu\text{A}$, $I_f=70 \mu\text{A}$, $v=10 \text{ mA/min}$. Se indica sobre los voltamperogramas la concentración total adicionada de H_2O_2 .

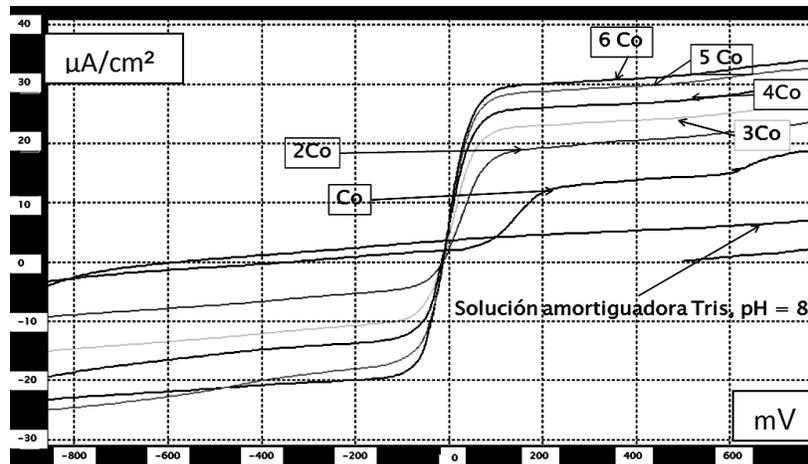


Figura 3. Voltamperograma de barrido triangular de corriente $E=f(i)$, de una mezcla de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ y $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $\text{Co} = 0.5\text{mM}$ $\text{ET}=\text{Au}^0$, $\text{ER}=\text{Ag}^0/\text{AgCl}$, $\text{EA}=\text{Acero inoxidable}$. Programa de 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 0.1M 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.

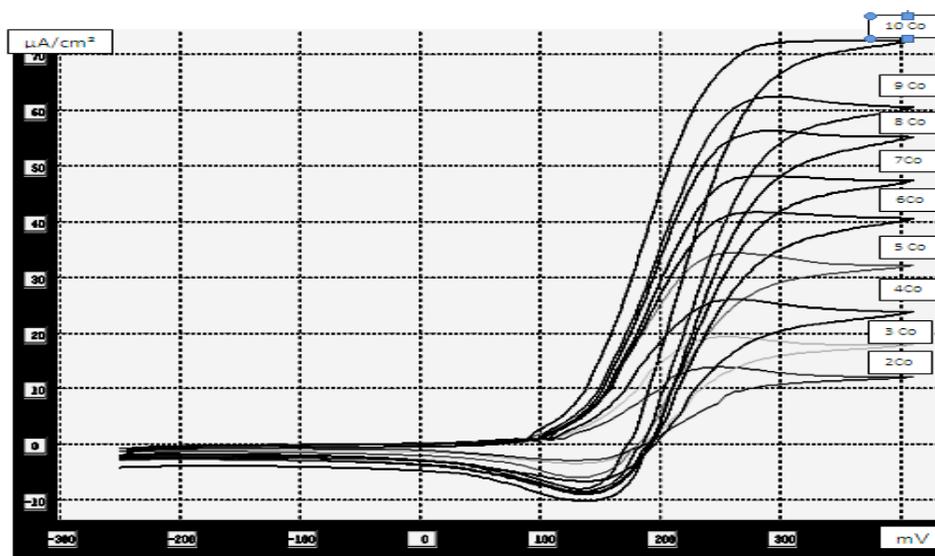


Figura 4 Voltamperogramas de 0.1M $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($\text{Co} = 0.01\text{M}$) y sus respectivas diluciones 1/10, 2/10, 3/10, 4/10, 5/10, 6/10, 7/10, 8/10 y 9/10. $\text{Co} = \text{ET=oro}$, $\text{ER} = \text{Ag}^0/\text{AgCl}$, $\text{EA} = \text{Acero inoxidable}$, $E_o = -250$ 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 0.02M 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, $r^2 = 0.9690$.

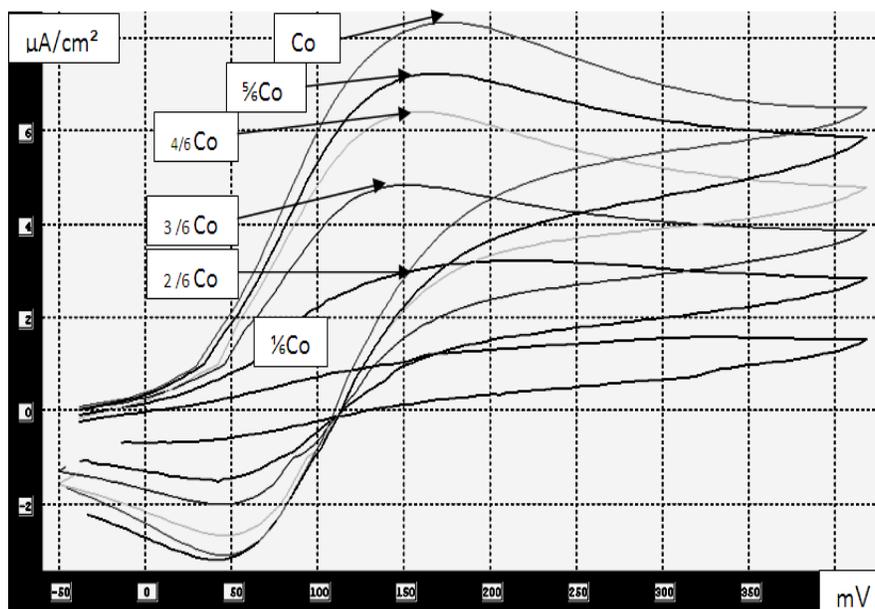


Figura 5, Voltamperogramas obtenidos en la microcelda construida, $V = 60\mu\text{L}$ para $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($\text{Co}=0.01 \text{ M}$) y sus respectivas diluciones 1:6, 2:6, 3:6, 4:6, 5:6. ET=oro, ER= $\text{Ag}(\text{s})|\text{AgCl}(\text{s})|\text{NaNO}_3(0.1\text{M})|\text{NaNO}_3 0.1\text{M}|| \text{EA}=\text{Acero inoxidable}$. $E_0 = -250 \text{ mV}$, $E_{\text{inversión}}= 410 \text{ mV}$; $v = 300 \text{ mV/min}$.

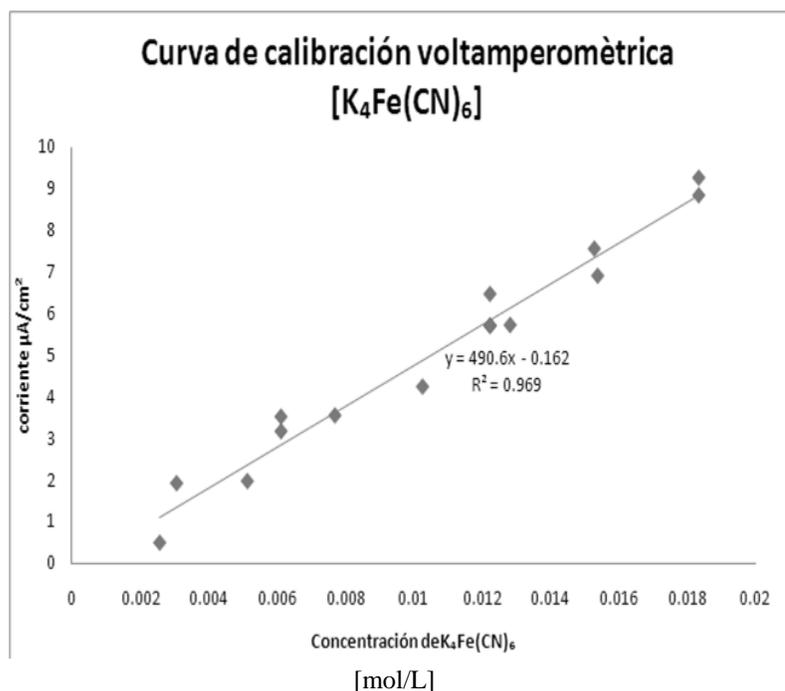


Figura 6., Curva de calibración voltamperométrica obtenida a partir de la corriente de pico anódico y las respectivas concentraciones de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ estándar adicionado a la microcelda construida. Empleando dos compartimentos para el electrodo de referencia y el electrodo auxiliar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

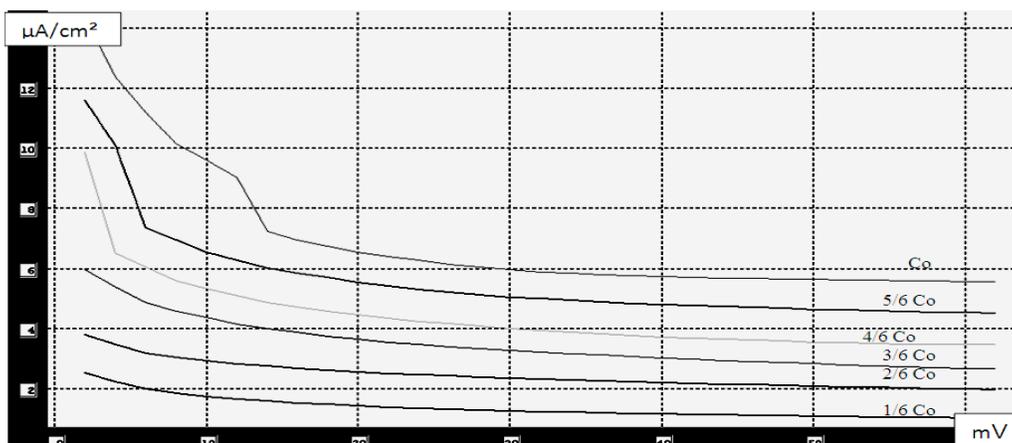


Figura 7, Cronoamperogramas obtenidos en la microcelda construida para 50 μ L de una disolución de $K_4[Fe(CN)_6]$, ($Co=0.01$ M) y sus respectivas diluciones 1/6, 2/6, 3/6, 4/6, 5/6., ET=oro, ER=Ag(s)|AgCl(s)|NaNO₃(0.1M), “1 compartimento” y el EA=Acero inoxidable en contacto directo con la solución. 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

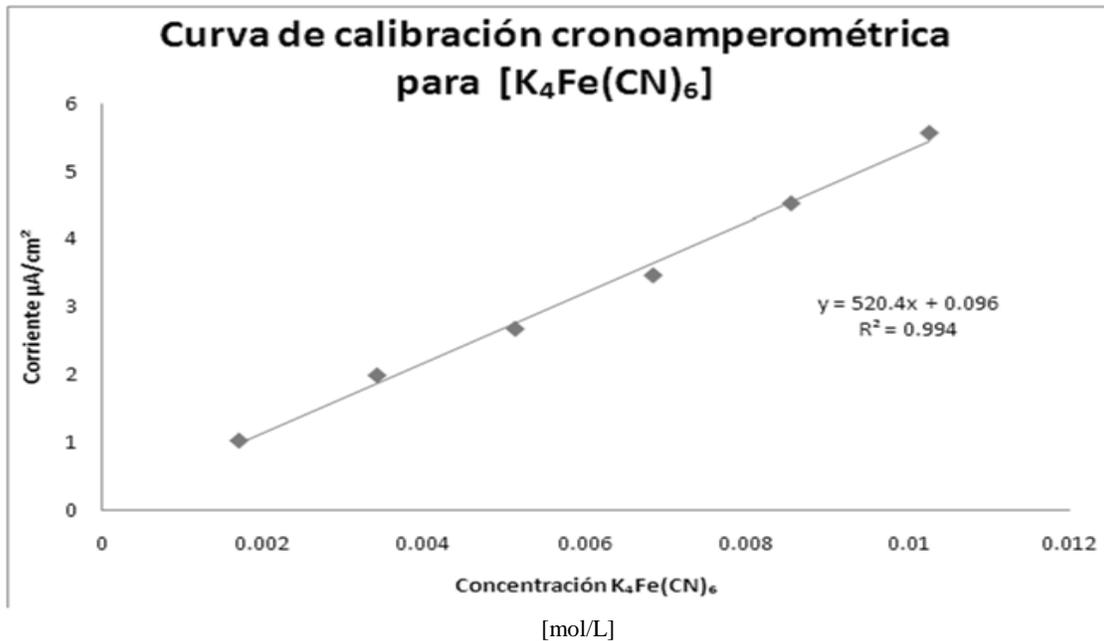


Figura 8. Curva de calibración cronoamperométrica, $I_{\tau} = f(C)$ para soluciones estándar de $K_4[Fe(CN)_6]$ después de aplicar un potencial de 170 mV para un tiempo de muestreo $\tau = 60$ s. Electrodo de referencia compartimentalizado.

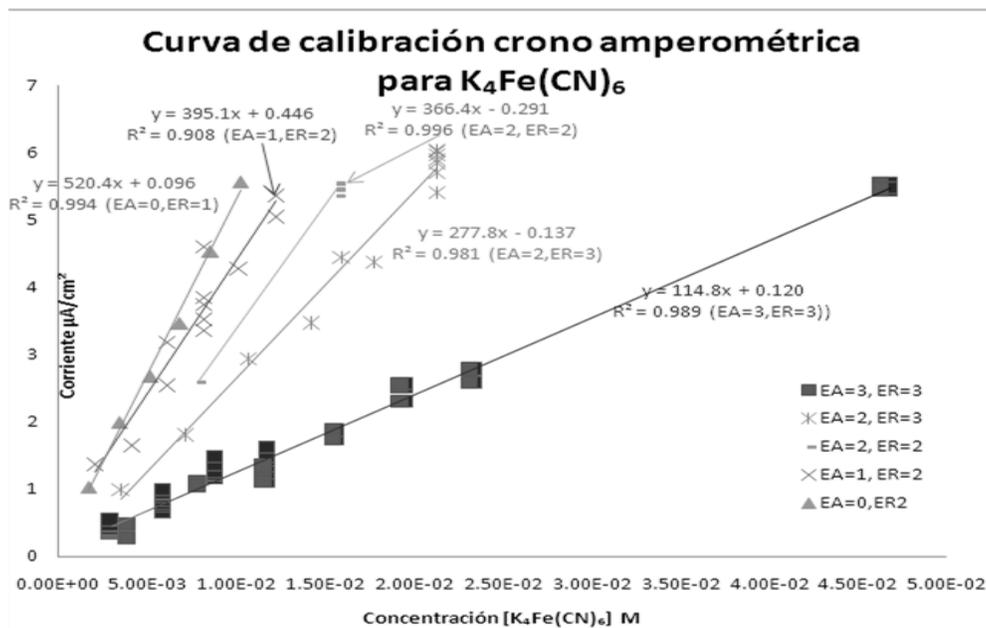


Figura 9. Curva de calibración cronoamperométrica, $I_{\tau=60s} = f(C)$ para soluciones estándar de $K_4Fe(CN)_6$ en las cuales se emplearon un número diferente de compartimentos para el electrodo de referencia y para el electrodo auxiliar.

Microcuantificación de Glucosa.

Una vez construidas las curva de calibración cronopotenciométricas para el $K_4[Fe(CN)_6]$. Se adicionaron a un pocillo 40 μL de la concentración 0.01 M de $K_4[Fe(CN)_6]$ más 10 μL de glucosa y 10 μL 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 figura 10 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 compartentalizaciones.

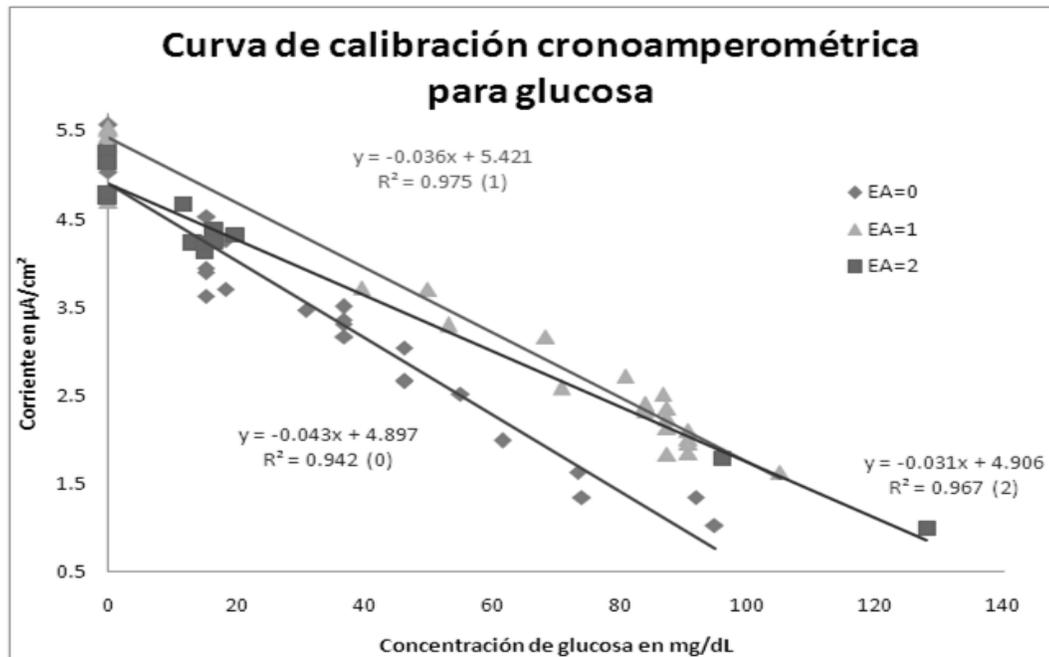


Figura 10. Curva de calibración cronopotenciométrica, $I_{(E=170\text{mV}, \tau=60\text{s})} = f(C)$ para la determinación de glucosa estándar en la microcelda. El electrodo de referencia se compartamentalizó 2 veces en todos los experimentos. El electrodo de auxiliar no compartamentalizó en (0), se 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 μL de la concentración 0.01 M de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ y 10 μL sangre obtenida por punción pulgar. Se adicionaron 10 μL 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⁽¹⁰⁾, 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 K_m and V_{max} 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).