

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



PROGRAMA DE ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

Determinación microelectroanalítica de hemoglobina humana

TESINA

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

ESPECIALISTA EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

PRESENTA

Q.A. LUIS MACEDO SEGURA

TUTOR: DR. JOSÉ ALEJANDRO BAEZA REYES

AÑO: 2012

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: EBC Lina Romero Guzmán

VOCAL: Dr. José Pérez Jáuregui

SECRETARIO: EBC Ana Margarita Zavala Ortiz

PRIMER SUPLENTE: M en C Isela Montúfar Robles

SEGUNDO SUPLENTE: M en C Arturo de Jesús García Mendoza

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Electroquímica Analítica, Investigación y Enseñanza Experimental. Anexo

3F, Edificio A, Facultad de Química, Ciudad Universitaria, UNAM

ASESOR:

DR. JOSÉ ALEJANDRO BAEZA REYES

SUSTENTANTE:

Q.A LUIS MACEDO SEGURA

DEDICATORIA

A Dios por permitirme realizar este deseo.

A mis padres Ángela y Abertano por su
Gran apoyo, paciencia, enseñanza y perseverancia.

A mis hermanos: Javier, Jaime, Héctor, Abertano,
Lulú, y Miguel Ángel. Por su compañerismo y amistad.

A mis sobrinos y ahijado David.

A mi ángel, compañera y amiga Magdalena.

A todos y cada uno de mis amigos
¡Gracias por los momentos compartidos!

A todo aquel que me ha apoyado

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Química.

A la Coordinación de la Especialidad en Bioquímica Clínica.

Al Dr. José Alejandro Baeza Reyes Por su valiosa ayuda
en la dirección de este proyecto.

Al jurado revisor de este trabajo por sus consejos y apoyo.

A todos mis profesores y a todas aquellas personas que de alguna manera Influyeron
para la culminación de esta etapa.

INDICE

I	ABREVIATURAS.....	1
II	RESUMEN.....	2
1	ANTECEDENTES.....	3
1.1	Sensores electroquímicos.....	3
1.2	Electrodos compósitos.....	5
1.3	Líquidos iónicos.....	6
1.3.1	Tetrafluoroborato de 1-etil-3-metil-imidazolio,[emim][BF ₄].	8
1.4	Sensores serigrafiados.....	9
1.5	Voltamperometría cíclica.....	12
1.6	Hemoglobina.....	14
1.6.1	Métodos para determinación de hemoglobina.....	16
2	OBJETIVO GENERAL.....	19
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	20
3.1	Disolventes y reactivos utilizados.....	20
3.2	Instrumentos de medición.....	21
3.3	Electrodos y sistemas electroquímicos.....	22
3.3.1	Sistema 1 electrodos compósitos.....	22
3.3.2	Sistema 2 electrodos sólidos en medio homogéneo.....	23
3.3.3	Sistema 3 electrodos serigrafiados.....	24
4	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	29
5	CONCLUSIONES.....	46
6	EXPECTATIVAS.....	47
7	BIBLIOGRAFÍA.....	48

I. ABREVIATURAS

A	Unidad de corriente eléctrica (Ampers).
Atm	Atmosfera.
CPILE	Electrodos de pasta de carbón y líquido iónico.
CPILE-Hb	Electrodos de pasta de carbón y líquido iónico con hemoglobina.
EA	Electrodo auxiliar.
[emim][BF ₄]	Líquido iónico. Tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazolio.
E _{ox}	Potencial de oxidación.
ER	Electrodo de referencia.
E _{red}	Potencial de reducción.
ET	Electrodo de trabajo.
g	Gramos.
g/dL	Gramos por decilitro.
Hb	Hemoglobina.
HbA1	Fracción mayor de las glucohemoglobinas.
HbA1c	Subfracción de la HbA1.
LC ₅₀	Concentración de un producto inhalado que es capaz de provocar la
LI	Líquido iónico.
mg	Miligramo.
mL	Mililitro.
mV	Milivolts.
mV/min	Milivolts por minuto.
μL	Microlitros.
μg	Microgramos.
μA	Microampers.
NO _x	Óxidos de nitrógeno.
PET	PolyethyleneTerephtalate.
S	Desviación estándar.
SPE(s)	Electrodo(s) serigrafiado(s).
V	Unidad de diferencia de potencial eléctrico (Volt).
V.N	Valor normal.

II. RESUMEN

La exigencia de resultados rápidos, confiables en tiempo y forma en el ámbito clínico ha llevado al desarrollo de sensores pequeños y de fácil manejo para el clínico o el paciente que permiten responder de manera inequívoca a un análisis en el seno de una muestra compleja como lo son los fluidos humanos. Estos constan de dos partes: el elemento de reconocimiento y el transductor quien se encarga de medir y procesar la información. Cuando el transductor es un electrodo, el sensor se denomina sensor electroquímico, estos sensores hacen uso de las propiedades de la corriente eléctrica (potencial, intensidad de corriente, y conductividad) y su relación con un análisis en particular. El sensor electroquímico más conocido es el de glucosa que nos arroja un valor puntual del contenido de glucosa en sangre necesaria para el manejo de pacientes diabéticos, pero la medición de glucosa unida a hemoglobina arroja un valor “histórico” del control de glucosa de hasta 3 meses antes. Por ello como un preámbulo a la determinación de hemoglobina unida a glucosa nos propusimos probar la utilidad de los microelectrodos de pasta de carbón utilizando un líquido iónico como sistema aglutinante y el uso de los electrodos serigrafados (SPEs) comerciales como métodos alternos en la determinación de Hemoglobina en sangre. Para lo cual se usaron de 3 sistemas de electrodos: electrodos de pasta de carbón y líquido iónico, electrodos sólidos en medio homogéneo y SPEs (base carbón y platino). Se obtuvo el comportamiento potencioamperométrico en los tres sistemas aplicando hemoglobina liofilizada y líquido iónico. Se realizó la comparación en la cuantificación de hemoglobina usando los SPEs contra la obtenida en un equipo Sysmex KX21 determinado en sangre de 10 pacientes diluida en ferricianuro de potasio 0.1M y KNO_3 0.1M. En cuanto al uso de líquido iónico, aplicando el sistema de electrodos tradicional en medio homogéneo, logramos obtener una correlación directa entre la concentración de hemoglobina liofilizada y la corriente aunque los resultados no fueron reproducibles. Se logró obtener los parámetros potencioamperométricos que permitieron la medición cuantitativa de la hemoglobina con muestras de sangre de $10\mu\text{L}$ sobre los SPEs (DS-550 base platino), comparables con los obtenidos con el equipo Sysmex KX21. No se logró cuantificar la hemoglobina con SPEs (DS-110 base carbón); ni con electrodos de pasta de carbón.

“Un error no se convierte en verdad por el hecho de que todo el mundo crea en él.”

Mahatma Gandhi(1869-1948)

1. ANTECEDENTES

1.1 Sensores electroquímicos.

En la sociedad en la que vivimos cada vez se hace más indispensable el desarrollo de pequeños dispositivos de análisis que sean baratos, portátiles, fiables, selectivos, de fácil manejo y que requieran de cantidades muestra muy pequeñas (de hasta milésimas de mililitro) para determinar un parámetro concreto. Por ejemplo si se tuviese diabetes cada vez sería más fácil que se pueda autocontrolar la glucosa en sangre y con ello poder administrar en tiempo y forma la cantidad de medicamento que se requiera. Los sensores electroquímicos o biosensores electroquímicos hacen cada vez más que, esta expectativa sea una realidad(González y col, 2011).

De manera general se podría definir a un sensor químico como cualquier dispositivo capaz de responder de manera inequívoca con lo que se va a analizar (análito) en el seno de una muestra compleja. Aquel consta esencialmente de dos partes: el elemento de reconocimiento que interactúa con el análisis y concede selectividad al sensor y el transductor quien se encarga de medir y procesar la información que permite convertir esa interacción en una señal de carácter analítico. Cuando el transductor es un electrodo, el sensor se denomina sensor electroquímico y cuando en el elemento de reconocimiento intervienen especies biológicas (enzimas, anticuerpos, células, tejidos, etc.) entonces lo definimos como un biosensor. En la Figura A1 se observa el fundamento de un biosensor.(González y col, 2011).

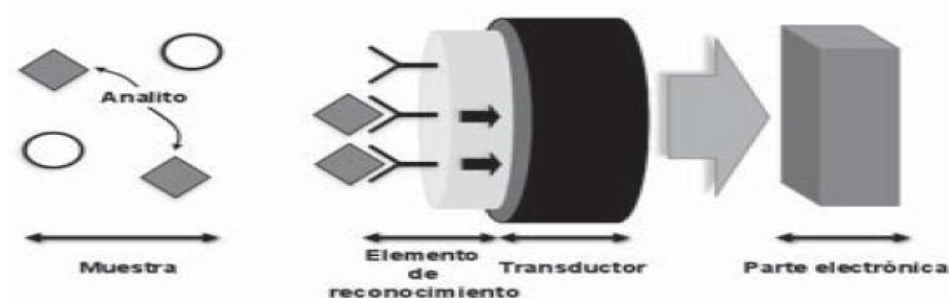


Figura A1. Esquema de un biosensor.(González y col, 2011).

Los biosensores electroquímicos hacen uso de las propiedades que presenta la corriente eléctrica tales como potencial, intensidad de corriente, y el inverso de la resistencia (conductividad) por lo que los podrían ser divididos en:

- **Amperométricos**: Determinan corrientes eléctricas asociadas con los electrones involucrados en procesos redox (oxidación-reducción).
- **Potenciométricos**: Usan electrodos selectivos para ciertos iones
- **Conductimétricos**: Determinan cambios en la conductancia asociados con cambios en el ambiente iónico de las soluciones

Biosensores Electroquímicos Amperométricos: Determinan corrientes eléctricas asociadas con los electrones en procesos de oxido-reducción.

El mejor ejemplo de este biosensor lo vemos en la determinación de glucosa, Figura A2. En él, la glucosa es oxidada a gluconolactona con intervención de la glucosa oxidasa y oxígeno molecular. El oxígeno se reduce a peróxido de hidrógeno desprendiendo 2 electrones que son detectados en el electrodo y son proporcionales al consumo de la glucosa(www.unizar.es)



Figura A2 Distintas partes de un sensor de glucosa de la casa Freestyle.

(González y col, 2011)

En electroanálisis el transductor es el electrodo o electrodo indicador, el cual convierte los procesos acoplados de transferencia de carga interfacial y de transferencia de masa en una corriente eléctrica en las técnicas voltamperométricas. A diferencia de la mayoría de los transductores se puede operar en sentido inverso; es decir, se puede imponer un flujo de corriente a través del electrodo de trabajo y emplearlo para controlar procesos de transferencia electrónica y/o detransferencia de masa, como sucede en coulombimetría, siendo posible además, la medida del potencial en la interface conductor-disolución durante el proceso. Muchos de los avances más significativos que se han producido en Química analítica en los últimos tiempos, han sido como consecuencia del perfeccionamiento de los transductores en términos de sensibilidad, selectividad, operatividad o economía. En electroanálisis, este problema puede enfocarse hacia el desarrollo de nuevos electrodos indicadores. Además su uso está muy diversificado en distintas áreas como se muestra en el cuadro A1 (www.unizar.es)

Cuadro A1 porcentajes de aplicación del electroanálisis en diversas áreas (www.unizar.es)

<i>Campo</i>	<i>Porción de mercado (%)</i>	<i>Tasa de crecimiento anual (%)</i>
Diagnóstico clínico	53	25
Control de procesos industriales	11	50
Instrumental médico	11	30
Veterinaria/Agrícola	8	60
Defensa	6	45
Medio ambiente	5	35
Investigación	3	50
Robótica	2	30
Otros	1	30

1.2 Electrodo compósito

Un electrodo compósito puede definirse como un material que consta de al menos una fase conductora en conjunción con al menos una fase aislante, siendo el caso más usual un material que contiene una fase conductora y una fase aislante. En general presentan una mayor relación ruido/señal.

Dentro de los electrodos compósitos encontramos a los electrodos de pasta de carbón. La pasta de carbono es un material compósito disperso (distribuido al azar), constituido por una mezcla de polvo de grafito y un líquido aglutinante. El tamaño de partícula del grafito oscila entre 5 y 20 μm .

En ellos la actividad electrocatalítica cobra una especial importancia en la determinación de analitos orgánicos, puesto que la mayoría de los compuestos orgánicos de interés presentan un sobrepotencial tan grande para su oxidación o reducción electroquímica, que su determinación sobre electrodos convencionales se hace difícil o incluso imposible. (Fernández, 1996)

Mecanismo de acción del electrodo de pasta de carbón

Acción directa del mediador redox utilizado como modificador en electrodos de pasta de carbono; modificador (M), analito (A); forma reducida (red), forma oxidada (ox).

La pasta de carbón ofrece una gran selectividad y sensibilidad gracias a la pre-concentración del analito por absorción-extracción (figura A3) (Fernández, 1996)

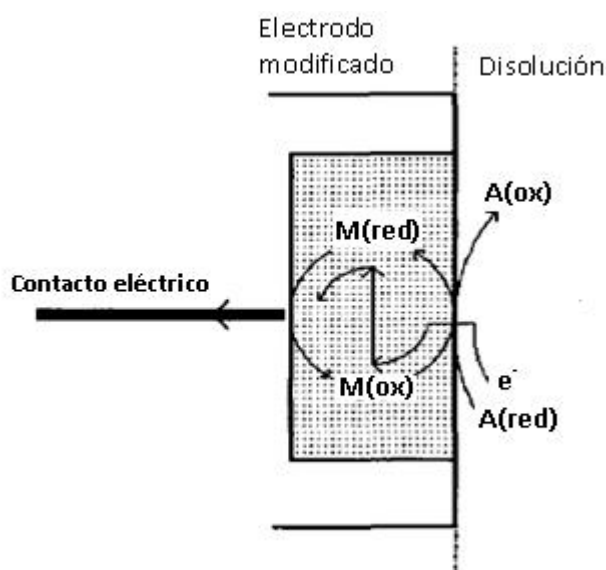


Figura A3. Mecanismo de acción del electrodo de carbón

1.3 Líquidos iónicos

Definición y propiedades químicas

Los líquidos iónicos son sales que presentan un punto de fusión menor a 100 °C (Johnson, 2007; Hapiot, 2008). Están compuestos por un catión robusto y asimétrico de carácter orgánico (tales como N,N-dialquil-imidazodio, amonio cuaternario, fosfonio, piridinio, etcétera) y por un anión convencional. Por tanto, estos sistemas pueden considerarse meramente iónicos, donde la proporción entre cargas es siempre 1:1. La importancia de estos sistemas radica en la posibilidad de trabajar con ellos como “sales fundidas” a temperatura ambiente. Por su nombre en inglés, algunos líquidos iónicos pueden ser llamados RTILs, *Room Temperature Ionic Liquids*.

El primer líquido iónico reportado fue el nitrato de etil-amonio, en 1914, por Walden durante la Primera Guerra Mundial, mientras buscaba formas alternativas de sintetizar explosivos. Este compuesto presenta un punto de fusión entre 12-14 °C y se forma por la reacción entre etilamina y ácido nítrico concentrado. Durante mediados del siglo XX, los reportes sobre líquidos iónicos fueron esporádicos, como medios de reacción para estudios electroquímicos y, en menor medida, como disolventes orgánicos. En las últimas décadas, el número de publicaciones sobre líquidos iónicos ha aumentado, de 40 publicaciones por año en la década de los 90's a cerca de 700 publicaciones en 2004, de acuerdo a la ISI Web of Science, *Emsley(2003)*. Actualmente, a nivel mundial, se está trabajando con líquidos iónicos para desarrollar reacciones químicas limpias y eficientes que eviten el uso de disolventes nocivos. (*García, 2011*)

Comparados con el agua, los líquidos iónicos resultan significativamente caros; sin embargo, pueden ser empleados en aplicaciones donde los sistemas acuosos presentan problemas o simplemente no es posible su uso. Por ejemplo, el agua muestra reactividad con muchos complejos catalíticos activos lo que se considera como un factor limitante, además, muchos sustratos son poco solubles en ella. (*Waddington,1969*). Los líquidos iónicos presentan una serie de características que los convierte en una familia de compuestos innovadores y potencialmente competitivos (*Johnson, 2007; Sigma Aldrich, 2005; García, 2011*).

- 1) La solidificación de un líquido iónico sucede a temperaturas bajas; y en algunos casos, cuando existe una larga cadena alifática en la estructura del catión, se observa una transición vítrea en lugar de un punto de fusión típico.
- 2) En atmósfera inerte, permanecen en estado líquido en un amplio intervalo de temperaturas (entre 200 y 300°C).
- 3) La fuerte interacción iónica entre las partículas que lo componen resulta en una insignificante presión de vapor.
- 4) Son sustancias no inflamables.
- 5) Su polaridad es moderada.
- 6) Presentan una amplia estabilidad electroquímica, térmica y mecánica.
- 7) Comparados con el agua, presentan una fuerte conductividad, es decir, una elevada movilidad iónica. Generalmente.
- 8) La viscosidad es elevada para algunos de ellos; sin embargo, es posible emplearlos en la mayoría de las metodologías analíticas.

9) La inmiscibilidad de algunos de ellos en agua y con otros disolventes orgánicos produce sistemas bifásicos que tienen amplias aplicaciones en sistemas de síntesis catalítica.

10) No son tóxicos ni abrasivos.

11) Son fácilmente reciclables y las impurezas asociadas pueden eliminarse por simple extracción con disolventes comunes.

12) Actúan como potentes catalizadores en muchas reacciones de carácter sintético.

En electroquímica, los líquidos iónicos son considerados como disolventes versátiles, gracias a su inherente conductividad pueden ser empleados como medios de reacción para diversas aplicaciones, sin la necesidad de adicionar un electrolito soporte que deba ser recuperado después de la electrólisis; sin embargo, algunas de las propiedades citadas pueden considerarse como desventajas desde un punto de vista electroquímico, como su gran viscosidad o su menor conductividad iónica comparado con la que exhiben los medios de reacción convencionales (en presencia de electrolitos soportes). La amplitud del dominio de electroactividad que exhiben es una medida de la estabilidad electroquímica de los procesos de oxidación y reducción al electrodo (*Sigma-Aldrich, 2005*), (*García, 2011*).

1.3.1 tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazolio, [emim][BF₄]

Existe una serie de líquidos iónicos que son ideales para el análisis electroquímico. Aquéllos que tienen el anión tetrafluoroborato han demostrado una gran estabilidad ante las diversas técnicas electroanalíticas (*Matsumoto, 2005*). Por esta razón se ha elegido al tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazolio como medio de estudio para este trabajo. Algunas de las propiedades de este LI (*Sigma-Aldrich, 2005*) son:

Fórmula: C₆H₁₁BF₄N₂ (*Sigma-Aldrich, 2011*)

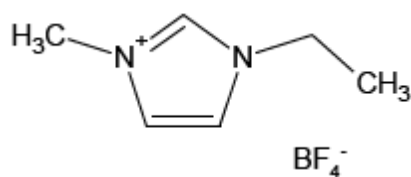


Figura A4 fórmula desarrollada del [emim][BF₄]

- Aspecto: Líquido viscoso, de color amarillo ligero.

- CAS No. 143314-16-3
- Masa molar: 197.97 g mol⁻¹
- Temperatura de transición vítrea: -92.0 °C
- Punto de fusión: 15.0 °C a 1 atm
- Punto de ebullición: >350.0 °C
- Punto de inflamación: 113.0 °C
- Conductividad: 11.5 mS cm⁻¹
- Ventana electroquímica (ET:Pt0): Ered -2.2 V; Eox 3.5 V ($\Delta E=4.1V$)
- Densidad: 1.294 g cm⁻³ a 25 °C
- Viscosidad absoluta: 34 mm s⁻¹
- Índice de refracción: 1.294
- Soluble en agua, Acetonitrilo y acetona; insoluble en isopropanol, tolueno y heptano.

Productos de descomposición peligrosos: monóxido de carbono, dióxido de carbono, óxidos de nitrógeno (NOx), óxidos de boro, ácido fluorhídrico.

Toxicidad: Perjudicial en caso de ingestión. Irrita los ojos y la piel en caso de contacto directo. La inhalación de sus productos de descomposición puede dañar las vías respiratorias(*García, 2011*).

Toxicidad en organismos específicos:

LC₅₀ en *Daniorerio*(pez cebra): 101.0 mg L⁻¹ en 96 h.

LC₅₀ en *Daphnia magna* (pulga de agua): 6.3 mg L⁻¹ en 48 h.

1.4 Sensores serigrafados

La tecnología de impresión de láminas (screen printing technology) es un procedimiento simple y rápido para la producción en serie de biosensores electroquímicos descartables. Esta técnica consiste en depositar láminas de tintas de diferentes propiedades electroquímicas y de forma y grosor controlados sobre un sustrato inerte. Luego se usan procedimientos de medición electroquímica tales como la potenciometría, la amperometría y la voltametría. Las tirillas impresas permiten varias formas de operación distintas: pueden ser introducidas en la solución, se puede depositar un pequeño volumen (ej. 40 µL) en la superficie del sensor para cronoamperometría o

incluso se puede depositar una pequeña cantidad de hidrogel sobre ambos electrodos para producir un sensor de gas.(Hart, 1997).

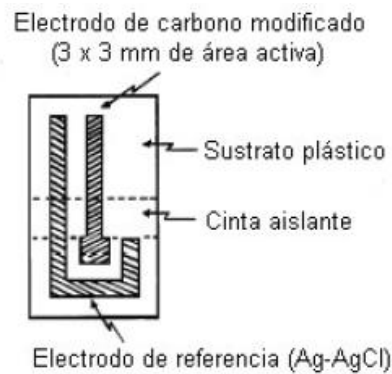


Figura A5. Diagrama esquemático de una tirilla de biosensor de láminas impresas

Los biosensores descartables poseen varias ventajas como el hecho de no sufrir contaminación y evitar los problemas de pérdida de respuesta debido a la acumulación de impurezas y la proteólisis (desnaturalización de las proteínas en aminoácidos por efecto de las enzimas). Una de las características más atractivas de la tecnología de láminas impresas es su versatilidad que permite imprimir un gran número de tintas en distintos sustratos y la posibilidad de modificar los componentes de la tinta.

La tecnología más usada en la fabricación de estos biosensores, es la llamada tecnología de láminas gruesas (Thick Film Technology.) Esta técnica, similar a la serigrafía, consiste en colocar una pasta conteniendo el material del electrodo en un tamiz, con la silueta de los electrodos debidamente definida, y forzar a la tinta a pasar a través de éste y depositarse en el sustrato plástico. El diseño dibujado en la parte “abierta” del tamiz es de esta forma transferido al sustrato.(Hart, 1997).

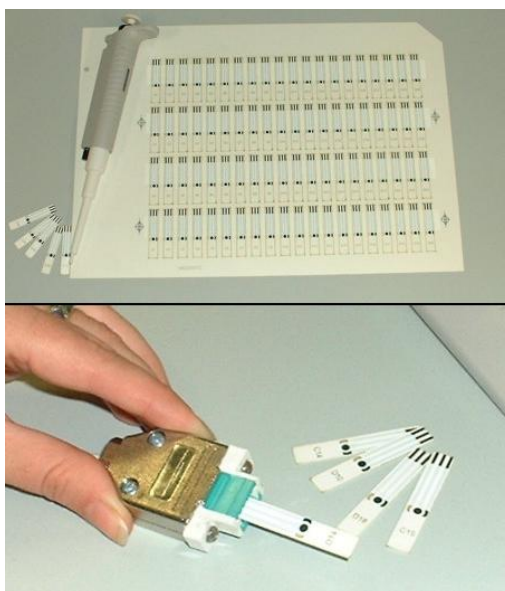


Figura A6. Ejemplo de hoja de tirillas (arriba) y biosensor conectado al transductor para medición (abajo)(Hart, 1997).

Los materiales normalmente usados como electrodos conductores incluyen al Platino, Plata/Paladio, Carbono dopado con Rodio o Platino e incluso simples pastas de grafito. Estas sustancias forman capas precedidas por dieléctricos aislantes y pastas de polímeros en el sustrato de PVC. (Hart, 1997).

Los sensores de electrodos serigrafiados DropSens^{MR} están basados en la tecnología híbrida capa gruesa, muy aptos para el desarrollo de sensores electroquímicos de diversa índole: químico, enzimático, inmune y genosensores. Estos sensores están dirigidos a importantes aplicaciones en los campos de análisis clínicos, del medio ambiente y control de los alimentos. Los electrodos serigrafiados ofrecen una serie de ventajas frente a los electrodos convencionales: son adecuados para trabajar con y para los ensayos de microvolúmenes descentralizados (punto de laboratorio o pruebas de punto de cuidado). Además evitan el pulido de los electrodos sólidos. Permiten su aplicación en potenciostatos portátiles los cuales pueden hacer uso de las principales técnicas electroquímicas, manteniendo la exactitud (DropSens, 2012).

El sistema para medición de hemoglobina BeneCheck^{MR} (General Life Biotechnology Co., Ltd, Taipéi, Taiwán) está hecho a base de tiras serigrafiadas y un medidor potenciométrico. La tira se construye mediante la técnica de impresión de pantalla sobre una superficie de tereftalato de polietileno (PET) en ella es serigrafiada una capa de plata como electrodo auxiliar. Pasta de carbón revestido en la parte superior de la capa de plata como electrodo de trabajo y Plata / cloruro de plata como electrodo de referencia. La sangre ingresa al sistema por capilaridad y entra en contacto con los

electrodos y un mediador lo que genera una respuesta típica por voltametría a 0.7 V respecto al electrodo de referencia de $\text{Ag}^0 / \text{AgCl}$. El mecanismo sugerido es que el mediador (GLBM) puede ser oxidado instantáneamente por una molécula de hemoglobina, o por una tensión superior a 0.7 V. debido a la transferencia de los electrones del mediador al ion férrico de lamolécula de hemoglobina, reduciendo el Fe (III) a Fe (II) cuando el mediador reacciona con la hemoglobina de la muestra. Cuando la sangre se introduce, el equipo induce un potencial de 0.7 V. Esto hace que el mediador se oxide y genera una corriente. La intensidad de la corriente generada es proporcional a la concentración del mediador restante sobre la superficie del electrodo e inversamente proporcional a la concentración de hemoglobina en la muestra de sangre entera(Ming-Song *et al* ,2011)

1.5 Voltamperometría cíclica

Una de las técnicas que más se emplea para estudiar mecanismos de reacción es la voltamperometría cíclica, ya que aporta información rápida acerca del comportamiento redox de las especies, de las reacciones químicas en que participan (mecanismos de reacción, reacciones químicas acopladas) y en la determinación de parámetros termodinámicos. Como se muestra en la Figura A7, la señal es de tipo triangular, es decir, a un número n de ciclos, sobre un electrodo estacionario, estático y en régimen de difusión pura (sin agitar)(Baeza,2011).

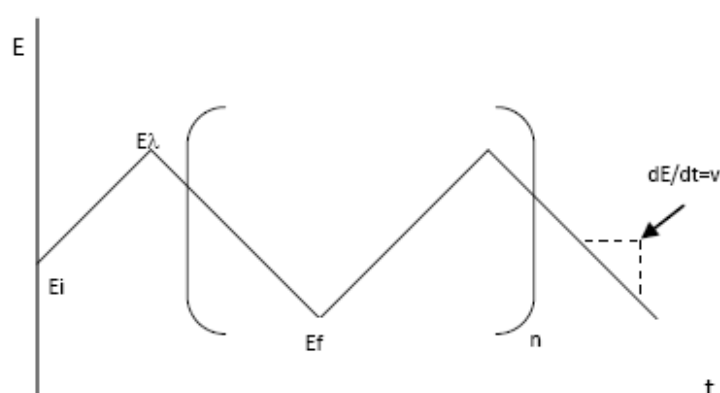


Figura A7. Programa de perturbación para voltamperometría de barrido triangular a n ciclos(Baeza,2011)

El ciclo suele darse varias veces, y los potenciales en los que acontece el cambio de la dirección de barrido reciben el nombre de potenciales de inversión ($E\lambda$). Los intervalos de potencial se escogen teniendo en cuenta los valores en los que se produce la oxidación o la reducción controladas por difusión de uno o varios análisis. La respuesta consecuente se llama voltamperograma cíclico y se obtiene al graficar la corriente leída al potencial asociado, en una curva del tiempo $E=(i)$. En la Figura A8 se muestra un ejemplo de voltamperograma donde se señalan las magnitudes físicas de este patrón de respuesta, en el ejemplo, una electrooxidación. (Baeza,2011)

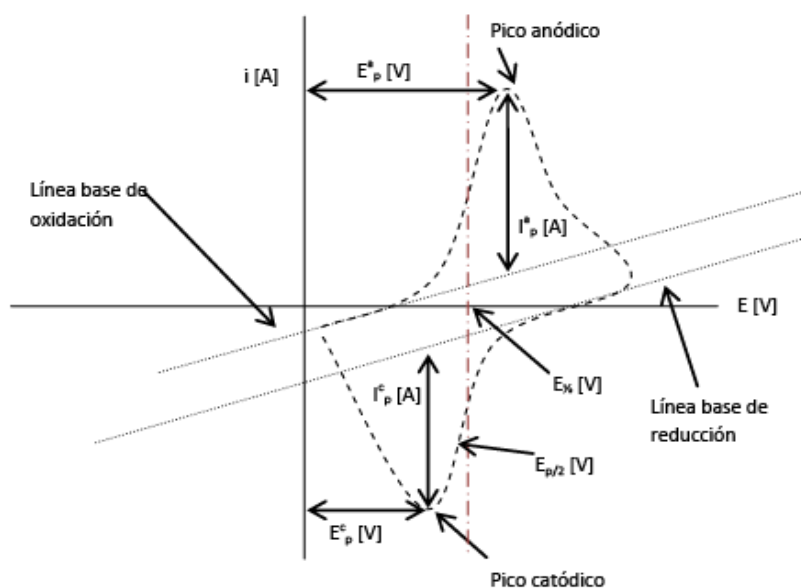


Figura A8. Magnitudes de un voltamperograma cíclico de acuerdo al convenio planteado por la IUPAC (Fogg.1999)

Esta técnica permite electrolizar una especie e invertir el potencial para comprobar la formación de su par redox, de esta forma es posible dilucidar mecanismos de reacción. Al variar la velocidad de barrido se puede estudiar la cinética de las reacciones o bien, detectar la aparición de especies intermedias en procesos redox. Si se analiza una muestra con dos o más análisis presentes, su comportamiento es particular, por lo que el voltamperograma resultante no es necesariamente la suma de los voltamperogramas individuales de cada análisis (Baeza,2011).

En la Figura A8. Se muestran los parámetros de un voltamperograma cíclico, donde:

E_p^c = potencial de pico catódico

E_p^a = potencial de pico anódico

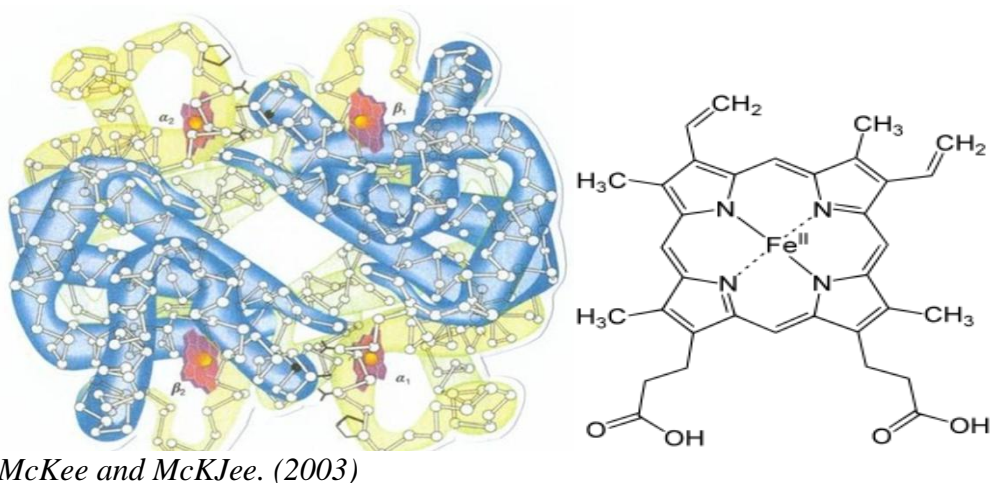
i_p^c = intensidad de corriente de pico catódico

i_p^a = intensidad de corriente de pico anódico

1.6 Hemoglobina

La Hemoglobina es una proteína conjugada que sirve para el transporte de O_2 y CO_2 . Cuando está totalmente saturada cada gramo contiene alrededor de 1.4mL de O_2 . La masa total de eritrocitos en el adulto contiene alrededor de 600g capaz de transportar 800mL de O_2 .

Una molécula de hemoglobina consta de dos pares de cadenas polipeptídicas y 4 grupos proteicos (HEM) que contienen cada una un átomo de hierro en estado ferroso (Fe^{2+}). Las cadenas polipeptídicas que son iguales 2 a 2, adoptan una posición helicoidal; lo que da a la molécula de hemoglobina una estructura esteroide. Cada grupo HEM se localiza en una zona determinada de una de las cadenas de polipéptidos. Localizada cerca de la superficie de la molécula, el HEM se combina de forma reversible con una molécula de O_2 ó CO_2 . Este grupo HEM es el responsable del color rojo de la hemoglobina. (Alors, 2008)



McKee and McKJee. (2003)

Figura A10. Hemoglobina (izquierda), Grupo HEM (derecha)

La parte proteica o globina tiene 4 cadenas polipeptídicas que se denominan con las letras α , β , γ y δ . Además existe la cadena ϵ que está presente durante los primeros 3 meses de vida. Se diferencian unas de otras en el número posición de los

aminoácidos que las componen. En el humano se encuentran normalmente las siguientes hemoglobinas:

Hemoglobina A. Consta de 2 cadenas α y 2 β . Está constituida en adultos más del 95 % del total de hemoglobina.

Hemoglobina A₂. Consta de 2 cadenas α y 2 δ . En adulto representa menos del 3%.

Hemoglobina F ó Fetal. Consta de 2 cadenas α y 2 γ . Es la hemoglobina principal en el feto desde el 4º mes de embarazo hasta aproximadamente 6 meses de edad. Está presente la mayor afinidad por el O₂.

Hemoglobina Góber. Consta de 2 cadenas α y 2 ϵ . Esta hemoglobina desaparece casi por completo en el tercer mes de embarazo y empieza a aparecer la hemoglobina fetal. *(Alors, 2008)*

La hemoglobina reducida corresponde a la hemoglobina con su hierro no asociado o no unido al O₂. Cuando cada grupo HEM se asocia con una molécula de O₂ la hemoglobina es llamada oxihemoglobina. Tanto en la hemoglobina como la oxihemoglobina el hierro aparece en estado ferroso Fe(II). Con el hierro oxidado al estado férrico Fe(III) la molécula pierde la capacidad de transportar el O₂ y/o CO₂. *(Palomo, 2005)*

Por otra parte, la anemia implica una disminución de la concentración de hemoglobina por debajo de lo normal y casi siempre del número de eritrocitos o del hematocrito. Constituye una alteración muy común y una frecuente complicación de otras enfermedades. El diagnóstico clínico de la anemia basado en la estimación visual de la piel y de las mucosas es de poca garantía, ya que, la anemia suele estar enmascarada por otras manifestaciones. Por esta razón la estimación correcta de la hemoglobina es importante y por ello una de las pruebas habituales que se lleva a cabo en los pacientes *(Palomo, 2005)*

Las glucohemoglobinas (hemoglobinas con azúcares unidos por enlaces covalentes se forman por mecanismos no enzimáticos en los eritrocitos, en cantidad proporcional al nivel de glucosa celular, la HbA1 es la fracción mayor de las glucohemoglobinas; constituye 6% a 8% de la hemoglobina total de las personas normales, pero puede llegar a 15%-18% en los diabéticos con mal control de la glucosa. La HbA1 puede ser separada en subfracciones, de las cuales la HbA1c es la predominante y mejor caracterizada. La HbA1c difiere de la hemoglobina original en que posee una glucosa

unida en forma covalente al grupo amino N-terminal de la cadena beta. Inicialmente se forma una base de schiff inestable entre el azúcar y la hemoglobina (denominado componente lábil de la hemoglobina) y luego se reordena dando la cetoamina estable A1c, también se encuentran pequeñas cantidades de glucohemoglobina que son producto de glucosilación no enzimática con otros azúcares. Entre ellos se encuentran: fructosa-1,6-difosfato (HbA1a1) y glucosa 5-fosfato (HbA1a2) unidos al n-terminal de la cadena beta.(Palomo, 2005)

La hemoglobina o HbA1c se analiza por HPLC, para determinar los niveles de glucemia durante un período de tiempo anterior a la extracción de aproximadamente tres meses, debido a que el eritrocito tiene una vida media de tres meses. Por lo general, los valores en sujetos no diabéticos no superan el 6%. Valores superiores señalan un control deficiente de la hiperglucemia. Los niveles bajos se han observado en pacientes con insulinoma. (Palomo, 2005)

1.6.1 Métodos para determinación de hemoglobina:

Anteriormente los métodos para la determinación de hemoglobina en sangre, estaban basados en las estimaciones de oxígeno o monóxido de carbono, o en el contenido del hierro. De todos los métodos solo el de Cianometahemoglobina ha ganado pluralidad y aceptación oficial. La técnica general fue propuesta por *Stodie (1920)*, este método utilizó reactivos separados de ferrocianida alcalina y de cianuro. Posteriormente *Drabkin y Austin (1935)* presentan un solo reactivo. En 1958 el Consejo Nacional de Investigación (NRC) de recomienda el uso del método de cianometahemoglobinabasándose en investigaciones hechas por el departamento médico militar de los Estados Unidos del Norte. En 1966 el Comité Internacional de Estandarizaciones en Hematología aprobó la propuesta de que todos los laboratorios clínicos debieran adoptar éste método exclusivamente. Posteriormente la *WorldHealthOrganization (1984)* con participación del comité internacional de estandarizaciones en hematología ratifica el uso del método Drabkin como método oficial para la determinación de hemoglobina en sangre humana.

El método de Drabkin. Se basa en la conversión de la hemoglobina de una muestra de sangre en cianometahemoglobina, ya que un medio alcalino, el ferricianuro de potasio oxida la hemoglobina y sus derivados a metahemoglobina (compuesto de colorido). La

intensidad del color es proporcional a la concentración de hemoglobina por lo que se puede realizar una determinación fotométrica a 525nm. La cuantificación se hace relacionando la absorbancia del problema con los valores obtenidos en la determinación de una curva patrón de hemoglobina estándar. La composición del reactivo de Drabkin básicamente es: Ferrocianuro potásico 200 mg Cianuro potásico 50 mg Bicarbonato potásico 1 g Agua destilada 100mL. (Alors, 2008)

Cromatografía por intercambio iónico, mide hemoglobina A1 más A1 lábil. Medición final por espectrofotometría a 415nm

Electroforesis, por diferencia de cargas en gel de agarosa o acetato de celulosa, mide hemoglobina A1 más A1 lábil, S1 y C1. Medición final por espectrofotometría a 415nm (Persee and Lawrence, 1990).

HPLC

Por columna de intercambio iónico, mide hemoglobina A1c más A1c lábil. Medición final por espectrofotometría a 415nm (Persee and Lawrence, 1990).

Colorimétrico,

No hay separación de Hb, pero deben eliminarse azúcares interferentes (fructosa y sacarosa libres) por diálisis. La glucosa unida a Hb es hidrolizada y convertida en 5-hidroximetilfurfural, reacciona con ácido-2 tiobarbitúrico (TBA) medido a 443nm. Se puede medir A1, otras glucohemoglobinas, no se determina glucohemoglobina lábil. (Persee and Lawrence, 1990).

Otros

Abbott Diagnostics. Fijación del hexafosfato de inositol (acidofítico) a un sitio específico cerca de la región N-terminal de la cadena beta. (Persee and Lawrence, 1990).

Otro basado en la determinación de la glucosa es el ensayo de la fructosamina, también se trata de una reacción colorimétrica.

Los equipos automatizados cuantifican la hemoglobina: por medición directa de la absorbancia (método de la cianometahemoglobina). El valor puede estar falsamente

aumentado en hiperleucocitosis elevadas. Se utiliza para la valoración de anemia. V.N.: hombres: 14-18; mujeres: 12-16 (g/dL). (*Hart, 1997*)

Recientemente se ha reportado la determinación directa de la hemoglobina inmovilizada en electrodos de pasta de carbón usando como soporte un líquido iónico toda vez que estos novedosos medios confieren propiedades reactivas alternativas a los medios acuosos y no acuosos convencionales (*Guo-XianMaet.al, 2007; Guan-Chao Zhaoet.al, (2007)*)

Venkat et al (2010) reportan un método patentado no enzimático electroquímico en el que miden simultánea el porcentaje de hemoglobina(Hb) y de hemoglobina glucosilada (HbA1c) en una muestra de sangre humana. La determinación de la cantidad total de hemoglobina se hace electroquímicamente midiendo por voltamperometría la corriente debido a la oxidación del hierro (II) a hierro (III) de la hemoglobina y la determinación del porcentaje de hemoglobina glucosilada (HbA1c) se hace por potenciometría. También se describe el serigrafiado del electrodo (SPE) modificado para la medición potenciométrica de HbA1c. La tira de electrodo serigrafiado (SPE) está compuesta por cuatro electrodos que comprenden un contra-electrodo, electrodo de trabajo, electrodo de referencia y un electrodo modificado constituido por un compuesto de ácido bórico insoluble en agua: el de trabajo y electrodos de referencia se utilizan para la estimación de la Hb por voltametría de pulso o amperometría diferencial; la referencia y electrodos modificados se utilizan para la estimación de la HbA1c por potenciometría; los electrodos están compuestos básicamente de carbón y de ácido bórico de 4-fenil-vinilo, ácido bórico y ácido aminofenil tiofeno bórico para el caso de electrodo de trabajo.

Otra característica que reporta el uso de una solución lisante de los glóbulos rojos para la liberación de hemoglobina en la que utilizan entre otros componentes etanol al 50% y dodecilsulfato de sodio. (*Venkat et al, 2010*)

2. OBJETIVO GENERAL

Probar la utilidad de los microelectrodos de pasta de carbón utilizando un líquido iónico como sistema aglutinante y el uso de los electrodos serigrafiados (SPEs) comerciales como métodos alternos en la determinación de Hemoglobina en sangre.

2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Diseñar la microcelda para utilización de microelectrodos de pasta de carbón-líquido iónico [emim][BF₄] y microelectrodos de pasta de carbón-líquido iónico [emim][BF₄]-Hb.

- 1) Hacer los estudios por Voltamperometría cíclica de los electrodos de pasta de carbón y líquido iónico (CPILE) y electrodos de pasta de carbón y líquido iónico con hemoglobina (CPILE-Hb).
- 2) Probar la utilidad de los electrodos serigrafiados (SPEs) de platino (DS 550) y de carbón (DS 110) en la determinación de hemoglobina humana.
- 3) Establecer la base para posteriores determinaciones selectivas de hemoglobina glucosilada acoplando el microelectrodo con la acción de una enzima en medio homogéneo o inmovilizada.

*La capacidad de superación depende
de jamás sentirse superior”
(Anónimo)*

3. MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1 Disolventes y reactivos utilizados

Todos los reactivos utilizados para este trabajo son grado reactivo analítico, toda la cristalería se lavó perfectamente y se enjuagó con agua destilada.

Lista de los reactivos y materiales utilizados:

Líquido iónico. Tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazolio (Aldrich: $C_6H_{11}BF_4N_2 > 99.0\%$). Acotado como [emim][BF₄].

Ferroceno, como sistema monoelectrónico de estudio y sustancia de referencia interna. (Fluka: $C_{10}H_{10}Fe > 98.5\%$).

Buffer de forfatos a pH=7, como electrolito soporte.

Nujol(aceite mineral), como medio aglutinante inerte.

Ferricianuro de potasio $K_3 [Fe(CN)_6]$ (Proanalysis artículo No. 4973).

KNO_3 (Merck 99.9%), como electrolito soporte.

Alambre de platino con un diámetro de 0.08 cm, para construir el Electrodo de Trabajo y el Electrodo Auxiliar de la celda electroquímica (Aldrich: $Pt^0 > 99.95\%$).

Barra de grafito con un diámetro de 0.08 cm, para construir el Electrodo Trabajo y el Electrodo Auxiliar de la celda electroquímica (Aldrich: $Pt^0 > 99.95\%$).

Alambre de plata con un diámetro de 0.10 cm, para construir Electroodos de Referencia de la celda electroquímica (Aldrich: $Ag^0 > 99.9\%$).

Electrodos serigrafiados de platino (DS 550) marca DropSens, integrado por: ET Disco de platino de 4mm de diámetro. EA de platino y ER de plata.

Electrodos serigrafiados de carbón (DS 110) marca DropSens, integrado por: ET Disco de carbón de 4mm de diámetro, EA de carbón y ER hecho de plata.

Agua destilada para los lavados pertinentes, con una conductividad de $2\mu S cm^{-1}$.

Alúmina en solución sobresaturada. Como agente abrasivo para limpieza de electrodos.

Hemoglobina liofilizada humana, (*Sigma Aldrich 2011*).

Muestras de sangre humana proporcionada por laboratorios clínicos ARCA.

Control de sangre hemolizada del Programa de aseguramiento de la calidad de los laboratorios clínicos (PACAL) proporcionado por laboratorios clínicos ARCA.

3.2 Instrumentos de medición

Para preparar las disoluciones a partir de los reactivos sólidos, se empleó una balanza analítica Sartorius® BP210s. Los reactivos y muestras líquidas se midieron con pipetas automáticas Eppendorf® de diversas capacidades de tirada. Se utilizaron puntas de plástico de un solo uso. Para lograr una buena disolución en algunas ocasiones se utilizó un sonicador Transsonic 310 Marca ELMA.



Figura M1. Potenciostato/Galvanostato, RADIOMETER COPENHAGEN.

En los ensayos en los que se usó el sistema 1 y 3 se realizaron mediante voltamperometría cíclica en régimen de difusión pura, por imposición de potencial, impuesto con un Potenciostato/Galvanostato modelo, marca *RADIOMETER COPENHAGEN*. Los registros voltamperométricos respectivos se obtuvieron gracias al programa Volta master 1 aplicación para Windows 97. (Figura M1)

Para el sistema 2 se utilizó un Potenciostato/Galvanostato Tacussel modelo PGP201. Los registros voltamperométricos respectivos se obtuvieron físicamente gracias a un graficador XY Yokogawa, modelo 3025.

3.3 Electrodo y sistema electroquímico

3.3.1 Sistema 1 electrodos compósitos

a) Electrodo de trabajo (ET)

Se utilizó un electrodo de trabajo de grafito construido para tal fin. Se trata de un barra de grafito 3.50 cm de largo y $d= 0.8\text{cm}$ montado dentro de una punta para pipeta automática de $100\mu\text{L}$ de capacidad. Para fijar grafito en su posición se utilizó silicón. La superficie geométrica en contacto entre el grafito y la disolución es un disco de $5.03 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$. En la Figura M2 se muestra un esquema del ET.



Figura M2. Electrodo de Trabajo y auxiliar construido para los experimentos electroquímicos(García, 2011)

b) Electrodo auxiliar, EA

Se utilizó un electrodo auxiliar de grafito construido para tal fin. Se empleó un barra de grafito de 5.0cm de largo y $d=0.08\text{cm}$ montado dentro de un capilar de una punta de pipeta

c) Electrodo de referencia, ER

Para el electrodo auxiliar se empleó un alambre de plata de 5.0cm de largo y $d=0.08\text{cm}$ con depósito electroquímico de AgCl(s) montado dentro de una punta de pipeta automática en cuyo extremo inferior se tapó con algodón para compartamentalizar y el interior se llenaba con buffer de fosfatos.

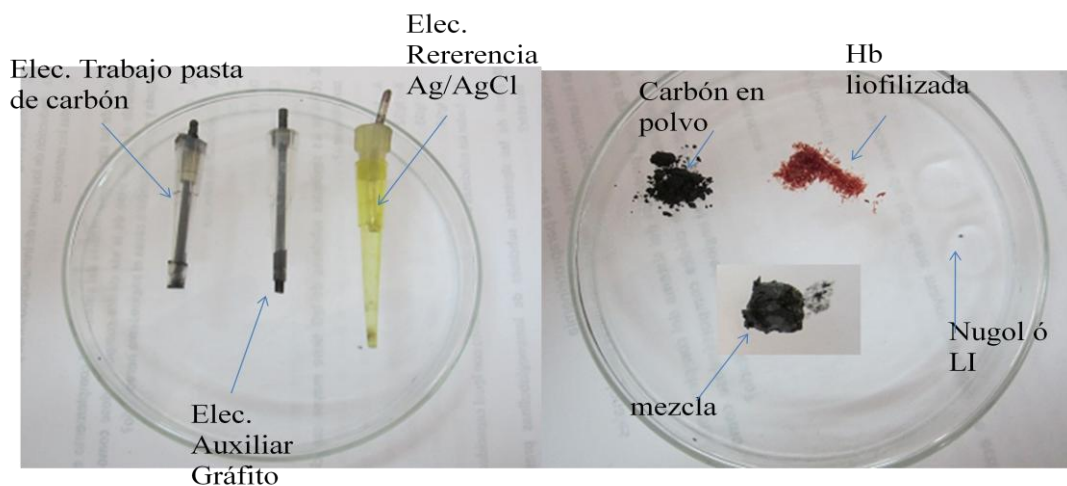
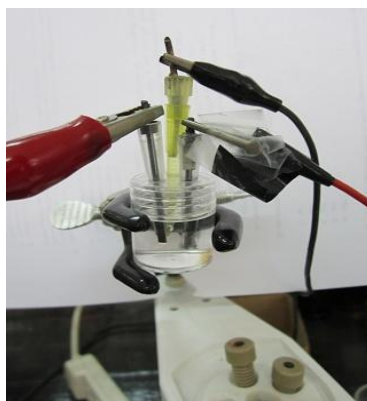


Figura M3. Elaboración de los electrodos

Montaje de electrodos en Celda electroquímica de 10mL

Se monta un sistema de 3 electrodos; Carbón, Ag/AgCl, pasta de carbón Figura M4 en el analizador. Los resultados fueron almacenados en el Software Voltmaster 1. Figura M1



FiguraM4.construcción de microcelda

3.3.2 Sistema 2 electrodos sólidos en medio homogéneo.

Los medios fueron analizados mediante voltamperometría cíclica en régimen de difusión pura, por imposición de potencial con un Potenciostato/Galvanostato, marca Tacussel modelo PGP201. Los registros voltamperométricos respectivos se obtuvieron físicamente gracias a un graficador XY Yokogawa, 3025. Se empleó una celda de 1 mL para los ensayos electroquímicos, se utilizaron los microelectrodos. EA: barra de Carbón, ER: Ag y ET: alambre de Pt. Tal como se observa en la fig. M5.

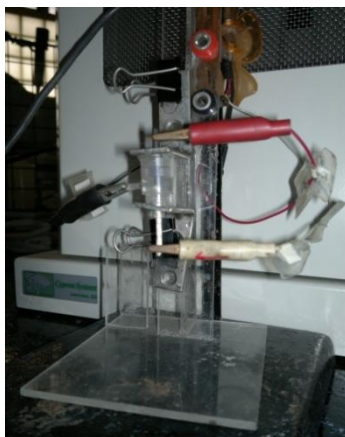


Figura M5. Montaje de la microcelda del sistema 2

3.3.3 Sistema 3 electrodos serigrafiados

Para las pruebas con los electrodos serigrafiados se utilizaron inicialmente los electrodos serigrafiados de carbón (DS 110) integrados por tres electrodos: ET es un disco hecho de carbón, EA también de carbón y ER hecho de plata.

Posteriormente se trabajó con los electrodos serigrafiados de platino (DS 550) integrados por tres electrodos: ET es un Disco de platino de 4mm de diámetro. EA hecho de platino y ER hecho de plata. La figura M6 muestra la localización de cada uno de los electrodos. (DropSens, 2012)

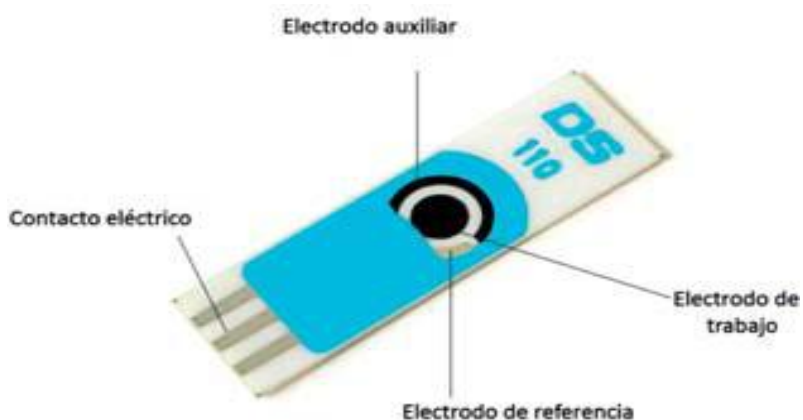


Figura M6. Electrodo serigrafiado (González y col, 2011).

Al utilizar el sistema 1 se trabajó inicialmente el comportamiento de oxidoreducción del hierro presente en el ferroceno para lo cual se prepararon 4 niveles de adición de ferroceno (0.0050g, 0.0100g, 0.0150g y 0.0200g) para su análisis a cada uno por separado se le adicionó 0.0400g de carbón en polvo y 0.0300g de nujol, se mezcló perfectamente con un espátula hasta formar una pasta homogénea y esta fue aplicada en la punta del ET del sistema 1. Para cada análisis se limpió previamente la cavidad del ET y posteriormente se aplicó la pasta. Se colocaron los electrodos en la celda como se muestra en la Figura M5 sumergiéndolos en buffer de fosfatos pH=7. Las condiciones impuestas fueron:

Potencial 0: -100mV
Velocidad 1 : 500 mV/min
Potencial 1 : 350 mV
Potencial 2 : -100mV

Se realizaron pruebas haciendo la pasta con 0.01g de hemoglobina liofilizada en lugar de ferroceno.

En el siguiente paso se sustituyó el nujol por líquido iónico, para lo cual se mezclaron 0.2 mL de LI[emim][BF₄], 0.0100g de Hb y 0.0400g de carbón.

En todos los casos se trazaron los dominios de electroactividad del buffer de fosfatos haciendo una pasta con 0.04g de carbón y 0.03g de nujol o LI. Las pastas se prepararon y aplicaron como se describió inicialmente.

Utilizando el sistema 2 con el fin de observar la señal de Hb en LI se preparó una solución de la hemoglobina liofilizada en el líquido iónico para lo cual se pesaron 0.0102 g de Hb y se llevaron al aforo con LI en un tubo eppendorf con capacidad de 2.0 mL. Para propiciar una solución homogénea, se limpió por vibraciones ultrasónicas utilizando el sonicador Transsonic (se hicieron 3 ciclos de limpieza ultrasónica). Las mediciones se hicieron con adiciones de 100 μ L en 100 μ L dentro de la celda y se midió cada una de ellas aplicando las siguientes condiciones de trabajo:

Potencial 0 : -500mV
Velocidad 1 : 500 mV/min
Potencial 1 : 1000 mV
Potencial 2 : -500mV

Al llegar a 500 μL la adición de la solución del Hb en el LI se hicieron barridos de potencial a diferentes velocidades (desde 100 mV s^{-1} hasta 700 mV s^{-1}).

Para las pruebas con electrodos serigrafiados (sistema 3) se preparó inicialmente Hb en buffer fosfatos $\text{pH}=7$ (0.0095g de Hb en 0.5 mL de fosfatos), de ésta se tomaron $100\mu\text{L}$ y se depositaron en los electrodos serigrafiados de carbón DS 110 (tal que se tuviese contacto con los tres electrodos mostrados en la fig. M6). Al mismo tiempo se analizó la solución de fosfatos como blanco. Las condiciones iniciales fueron:

Potencial 0: -800mV

Velocidad 1: 500 mV/min

Potencial 1: 500 mV

Potencial 2: -800mV

Posteriormente se probó ampliando la ventana electroactiva.

Debido a que no se obtuvieron señales claras con el procedimiento anterior se procedió a usar el líquido iónico [emim][BF₄] para lo cual en un tubo ependorf se preparó 0.0100g de Hb y se disolvieron en 0.2mL de líquido iónico corriéndolo en un amplio intervalo de potencial, desde -1000 a 2500 mV.

Debido a que los electrodos del SPE-110 se degradan con el líquido iónico se procedió a usar la misma solución de Hb (0.0100g de Hb en 0.2mL de LI) que en el ensayo anterior pero aplicándolo sobre electrodos serigrafiados de platino (DS-550).

Debido a los resultados obtenidos con el líquido resultaron poco satisfactorios se procedió a usar una mezcla de ferricianuro de potasio 0.1M en KNO_3 0.1M. Se prepararon las siguientes soluciones de Hb liofilizada mostradas en la Tabla 1. Para lo cual se pesó la cantidad requerida de Hb y se disolvió en $200\mu\text{L}$ de solución de Ferricianuro de potasio 0.1M en nitrato de potasio 0.1M.

Tabla 1

Hb (mg/0.2ml)	Equivalencia Hb (g/dL)
0	0
1,3	0,65
2,1	1,05
3,4	1,7
4,2	2,1
5,3	2,65
6,1	3,05
7	3,5
8,3	4,15
9,2	4,6
10,4	5,2

Se preparó el sistema de medición (SPE-550 conectados al potenciostato), las condiciones de los corrimientos fueron:

Potencial 0 : 500mV

Velocidad: 500 mV/min

Potencial 1 : -50 mV

Potencial 2 : -50mV

Para la medición se aplicaron 100 μ L por separado de la las distintas concentraciones de Hb en los electrodos del SPE. Se registró el valor de la corriente de cada corrida generada a potencial de cero volts.

Se repitió el experimento anterior se ansayó las siguientes concentraciones:

Tabla 2

Hb (mg/0.2ml)	Equivalencia Hb (g/dL)
0	0
1,2	0,6
2	1
3,1	1,55
4,1	2,05
4,8	2,4

Para poder observar si se tenía el mismo comportamiento con Hb liofilizada que en sangre total en el sistema 3. Se analizaron 10 muestras de sangre de 10 pacientes. A las muestras se les determinó previamente una biometría hemática con el equipo Sysmex KX21. Como parte de la calibración del equipo se usa un control de sangre hemolizada de PACAL el cual fue analizado al mismo tiempo. Las muestras fueron

mantenidas a congelación (-5°C) durante todo un día para su conservación y favorecer la hemolisis de los eritrocitos. Para su análisis microelectroanalítico fueron descongeladas previamente durante 30 minutos a temperatura ambiente y agitadas en el vortex. Se colocaron 100 µL sobre los electrodos del SPE y se registró el valor de la corriente de cada corrida generada a potencial de cero volts.

De cada muestra se tomaron 100 µL y se diluyeron con 900 µL de la solución de ferricianuro de potasio en nitrato de potasio. Para el control de PACAL se tomaron 10 µL y se diluyeron en 90 µL de la solución de ferricianuro de potasio. Se corrió a la vez un blanco de la solución de ferricianuro de potasio. Tomando como referencia el valor obtenido de corriente del control se determinó por simple relación la concentración de Hb de cada una de las muestras (se sabe que el control de PACAL reporta una concentración de Hb de 5.91 g/dL) y se comparó con los resultados de Hb arrojados por el equipo Sysmex KX21.

Para observar el comportamiento de la relación corriente respecto a la concentración de Hb en la sangre humana solo con el control: se tomaron 20 µL del control de PACAL y se diluyó agregando 180 µL de la solución de ferricianuro de potasio (solución 1). De la solución 1 se tomaron 50 µL y se diluyó con 50 µL de ferricianuro de potasio. Finalmente de la solución 1 se tomaron 10 µL y se diluyó agregando 90 µL de la solución de ferricianuro de potasio. Partiendo de que el control de PACAL reporta una concentración de Hb de 59.1 g/dL las diluciones obtenidas fueron de 5.91, 2.96 y 0.59 g/dL de Hb respectivamente. Al mismo tiempo se corrió un blanco de la solución de ferricianuro. Se registró el valor de la corriente de cada corrida generada a potencial de cero volts.

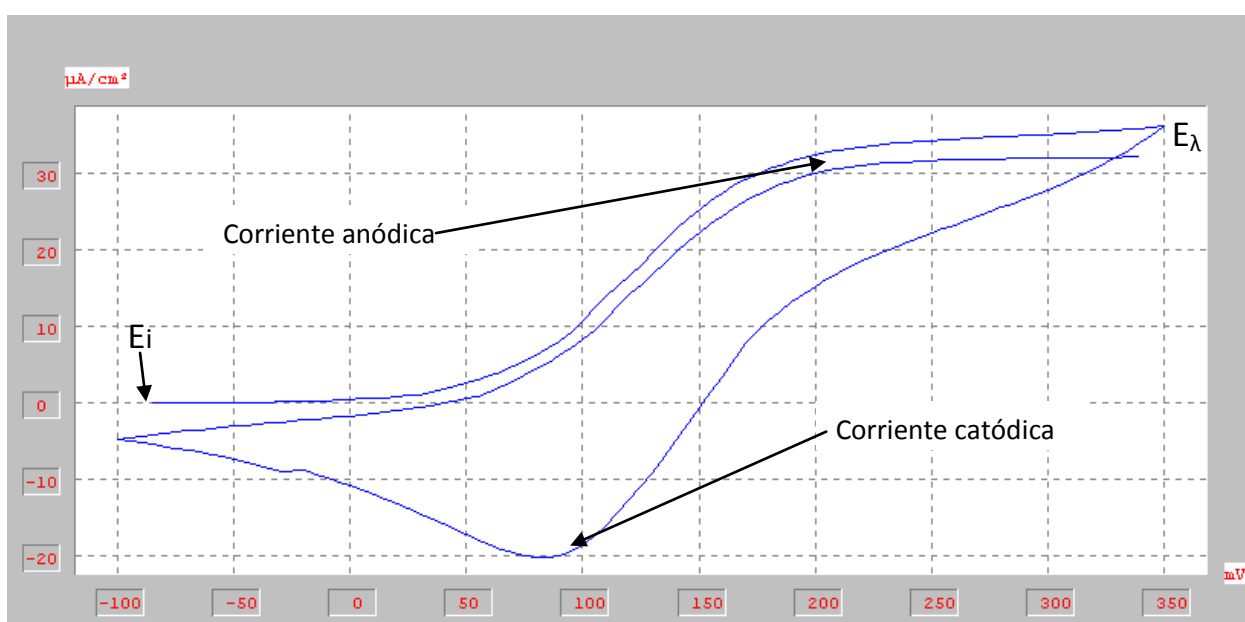
Sabiendo que las muestras presentaban concentraciones de aproximadamente 3 veces superiores (de acuerdo al reportado por el equipo Sysmex KX21) al control de PACAL y para poder generar una correlación directa con la gráfica de concentración de Hb en sangre control Vs corriente (para lo cual se utilizó la ecuación de la recta obtenida) se realizó la dilución de 6 muestras de sangre tomando 10 µL de sangre y agregando 290 µL de la solución de ferricianuro de potasio. La concentración se obtuvo multiplicando por 3 (factor de dilución) el valor obtenido a través de la fórmula $C = (Y + 35.257) / -26.938$ donde C = concentración g/dL y Y = al valor de la corriente ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) para cada muestra.

*¿Por qué entonces te has de envanecer?
Cuando el breve sueño pasa, despertamos eternos.
Tú morirás, muerte, y dejarás de ser.
(Fragmento deHolySonnets)*

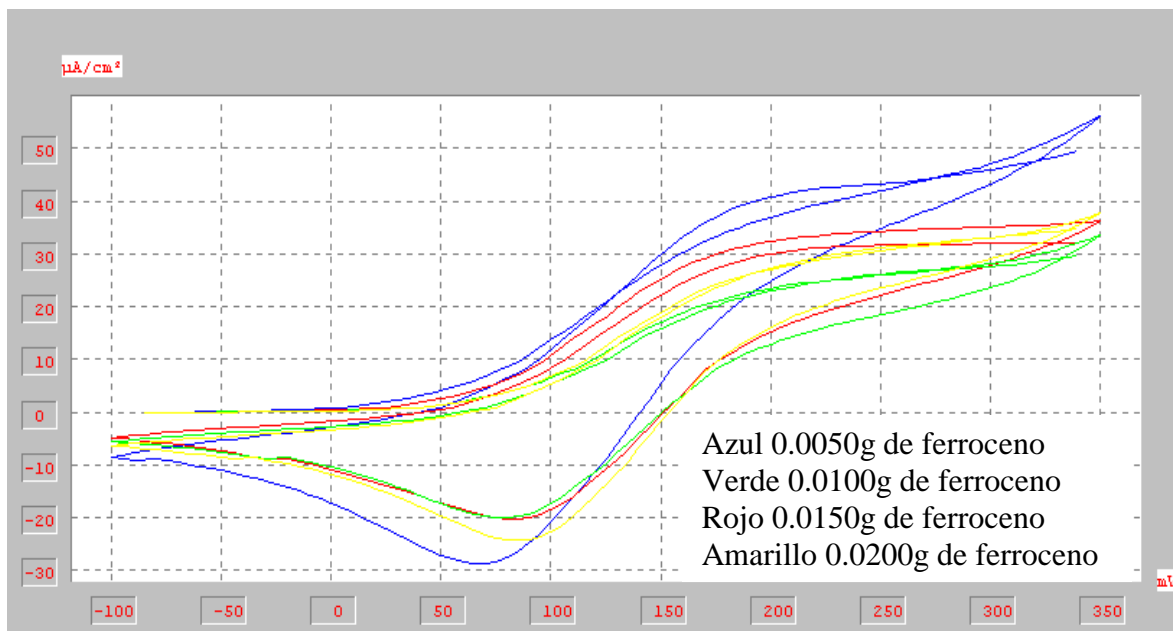
John Donne (1572-1631)

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

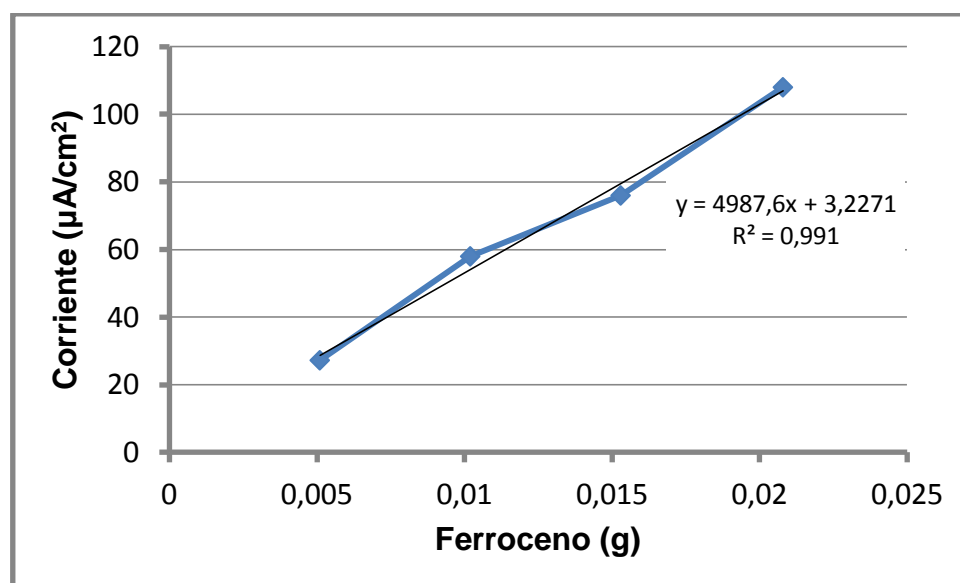
La grafica R1, R2 y R3 nos permiten observar el comportamiento de oxidoreducción del hierro presente en el ferroceno:



Grafica R1. Voltarometría cíclica, $i=f(E)$ de Fe^{2+} a Fe^{3+} del ferroceno en pasta de carbón y buffer de fosfato pH=7 como electrolito soporte



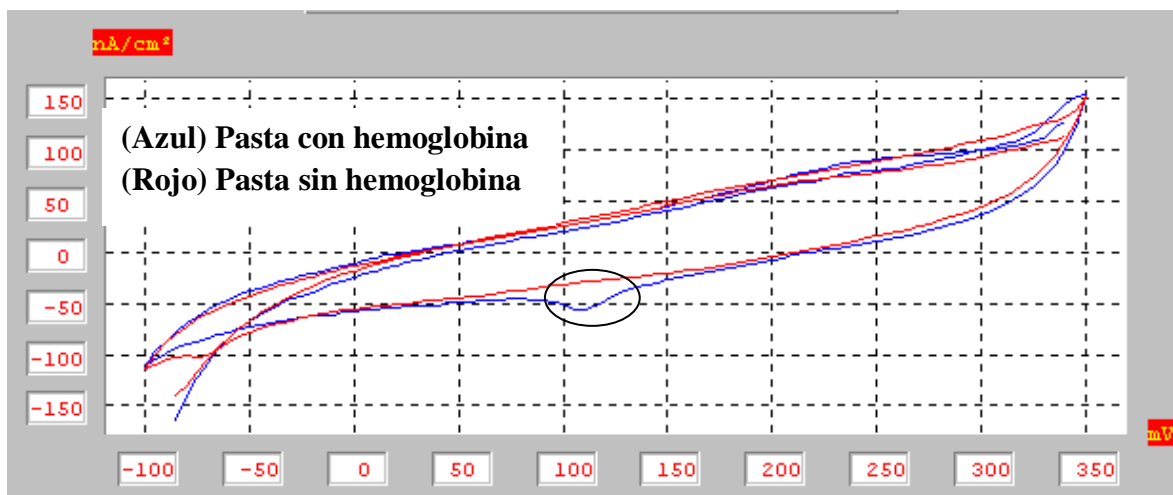
Grafica R2. Voltarometría cíclica, $i=f(E)$ de Fe^{2+} a Fe^{3+} del ferroceno en pasta de carbón y buffer de fosfato pH=7 como electrolito soporte a cantidades crecientes de masa de ferroceno en el compuesto



Grafica R3. Correlación corriente anódica vs masa de Fe^{2+} a Fe^{3+} del ferroceno en pasta de carbón y buffer de fosfato pH=7

La grafica R1 muestra el voltarograma clásico obtenido en la determinación y cuantificación de ferroceno. Se identifican los dos picos correspondientes a la oxidación del Fe(II) a Fe(III) (pico anódico) mostrado en la figura 8 y el pico catódico correspondiente. En la grafica R2. Se superponen las diferentes curvas obtenidas a diferentes masas de ferroceno y se observa que el potencial anódico y catódico se mantiene constante. Este resultado fue la pauta para saber que es posible la

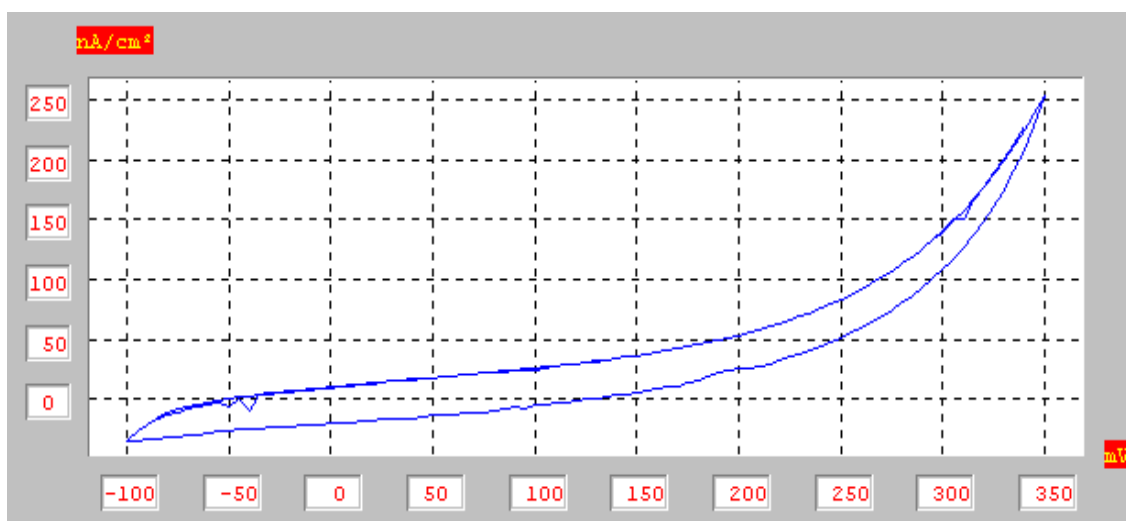
cuantificación de ferroceno por esta técnica, hecho que es demostrado en la gráfica R3 en la cual se observa una tendencia directamente proporcional entre la cantidad de ferroceno agregado y la corriente generada.



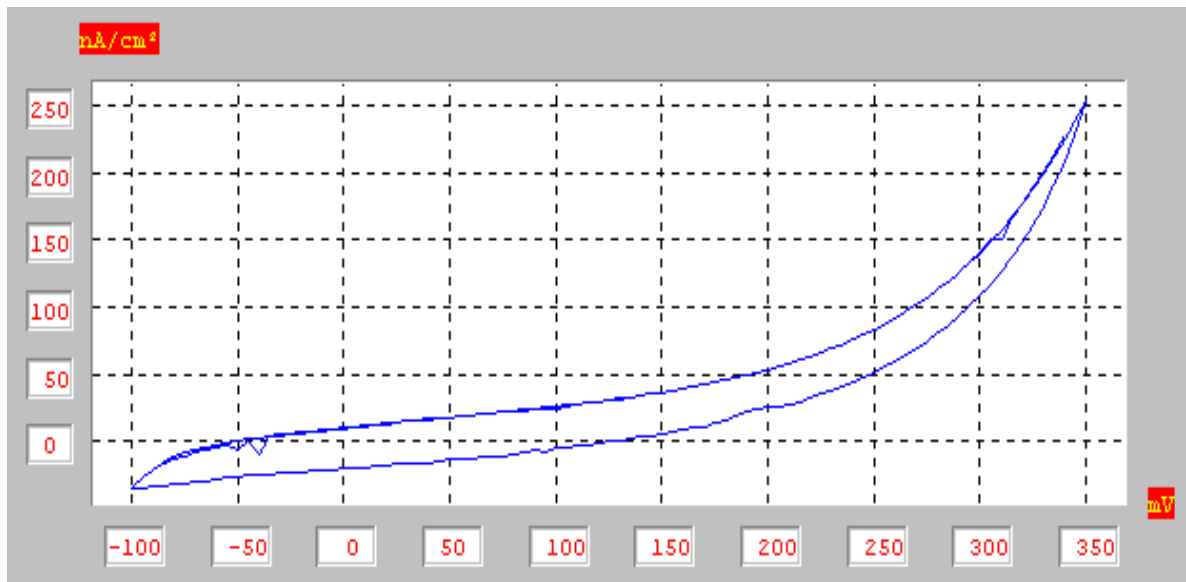
La Grafica R4. Comportamiento de la Pasta de carbón con 0.0100g de hemoglobina y pasta sin hemoglobina

La Grafica R4 nos muestra que al hacer la pasta con 0.0100g de hemoglobina iofilizada en lugar de ferroceno. Se logra obtener una señal mínima que no nos permite diferenciar la pasta con y sin hemoglobina.

En R6 se observa que al adicionar el líquido iónico no logramos obtener una señal que nos permita identificar a la hemoglobina si lo comparamos con R5 sin hemoglobina.



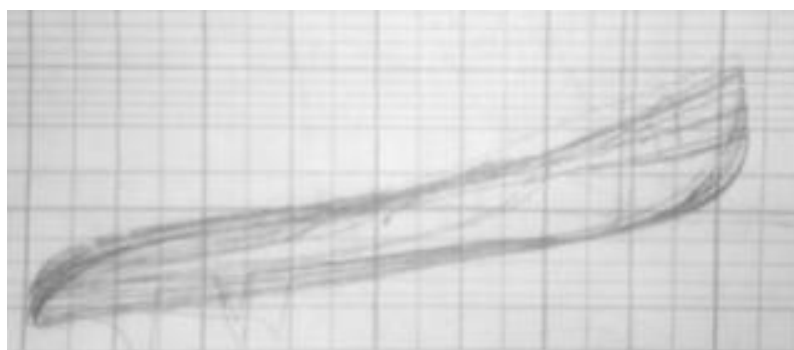
Grafica R5. Comportamiento de la Pasta de carbón con Líquido iónico [emim][BF4]



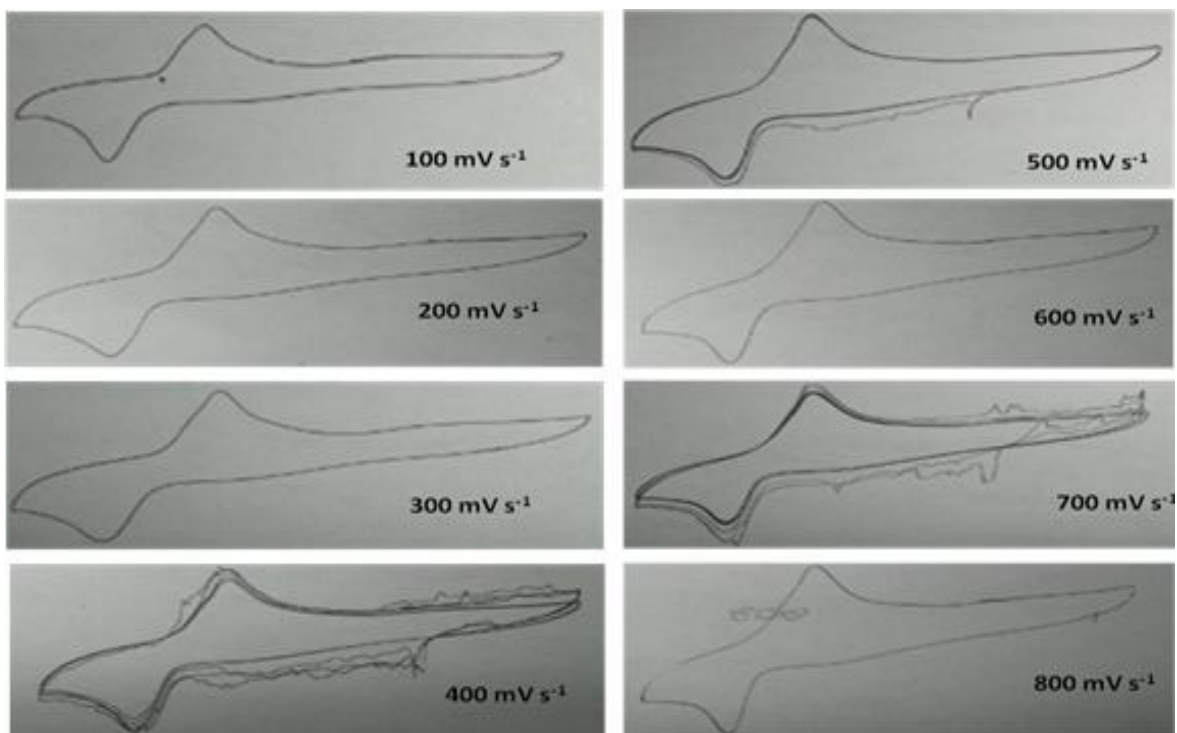
Grafica R6. Comportamiento de la Pasta de carbón con 0.01g de hemoglobina liofilizada y Líquido iónico [emim][BF₄]

En las graficas R7 y R8 podemos observar la señal de identificación de la hemoglobina en líquido iónico utilizando un método más tradicional como lo es el empleado en el sistema 2.

En R7. Se observan las graficas correspondientes a los barridos a diferentes velocidades, en todas ellas se observan los picos de oxidación y reducción del hierro de la hemoglobina, comparado con la grafica R5A correspondiente a tan solo el líquido iónico esto resulta evidente.

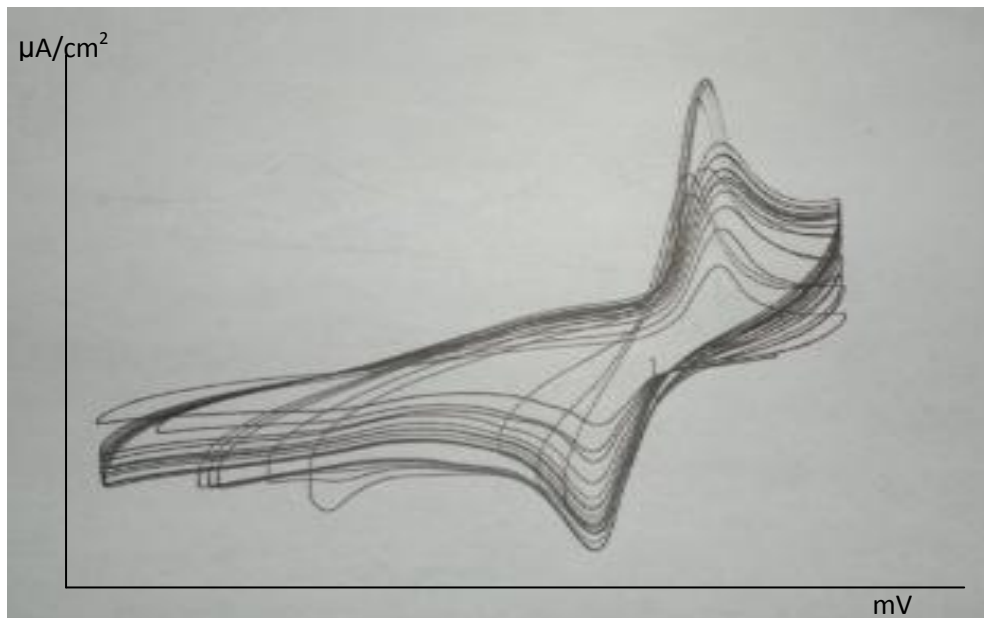


Grafica R6A. Voltarograma del Líquido iónico



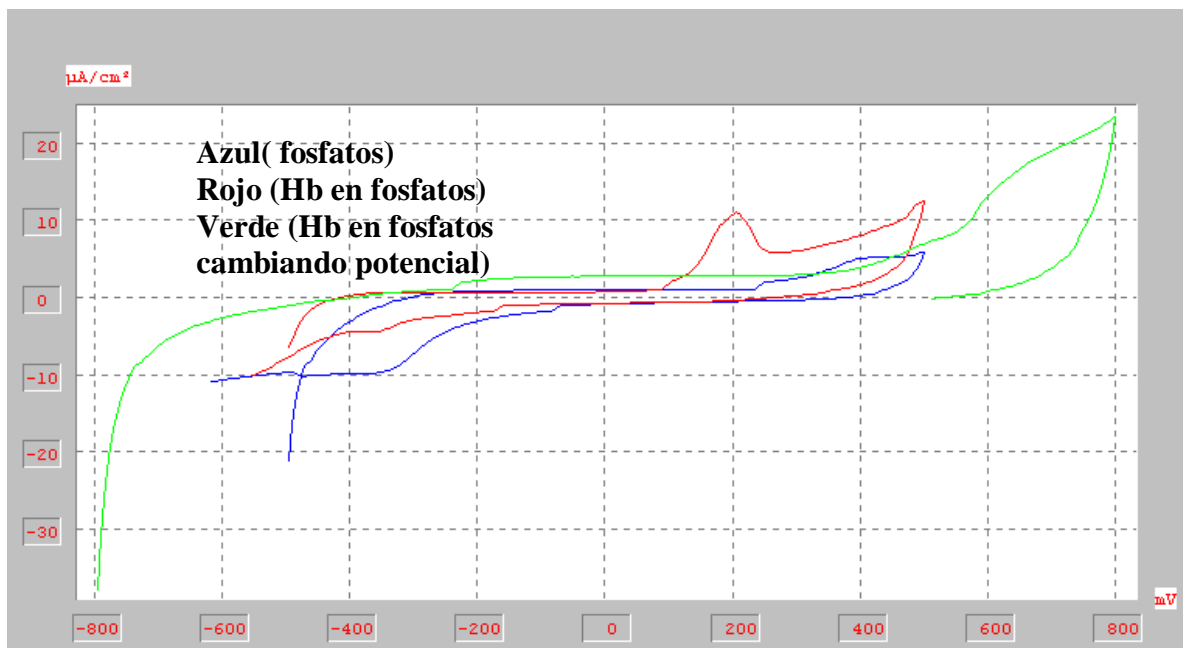
Grafica R7. Determinaciones de hemoglobina disuelta en el líquido iónico a distintas velocidades de barrido

Al sobreponer cada voltamperograma a los distintos barridos se obtiene el registro de la grafica R8. Al encontrarse los picos anódicos y catódicos en el mismo valor de potencial nos indica que se trata de la misma reacción de reducción Fe (III) a Fe (II) y la diferencia de altura de los picos corresponde a un valor de corriente distinto para distintas concentraciones que nos indica una relación directa entre la concentración de hemoglobina y la corriente. Estos resultados son prometedores; sin embargo, al tratar de reproducirlos no se logro obtenerlos. Pero hacen ver que es posible medir la hemoglobina en el seno del LI [emim][BF₄] utilizando un sistema de electrodos tradicional (plata, carbón y platino). En otrostrabajos como los realizados por *Guo-XianMaet.al,*(2007); *Guan-Chao Zhaoet.al,* (2007) en forma independiente hacen ver que es prometedor el uso de los líquidos iónicos en este campo sin embargo se requiere de una mayor investigación en el área.

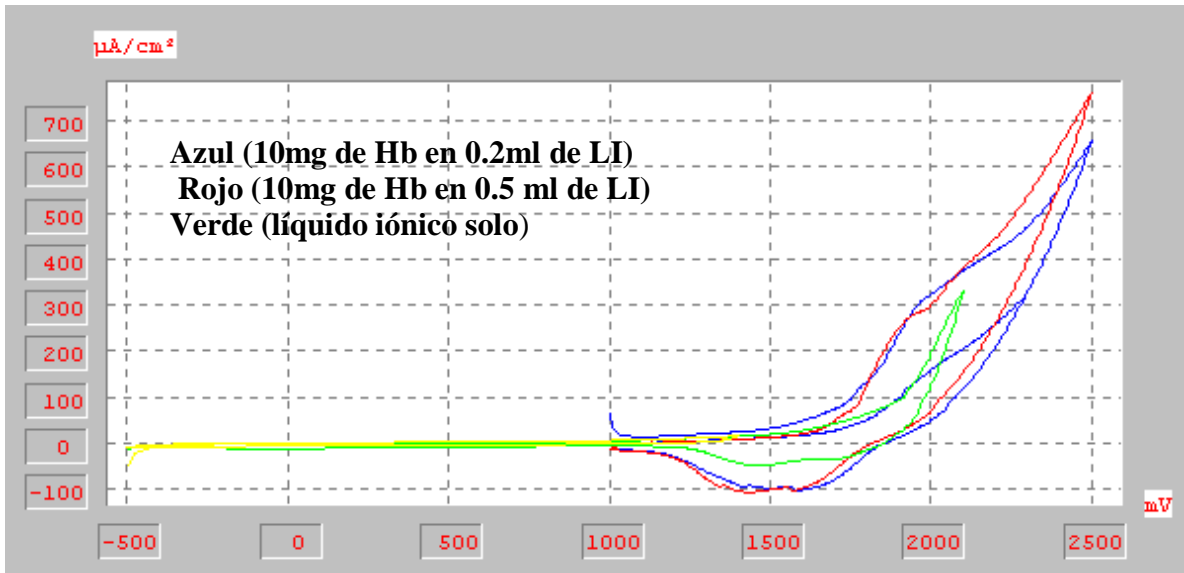


Grafica R8. Sobreposición de voltamperogramas de grafica R7

En la grafica R9 en la curva roja se observa un pico a 200mV que nos sugiere un proceso de oxidación. Al ampliar la ventana electroanalítica hasta 800mV ya no se observa, por lo tanto al disolver la hemoglobina en buffer de fosfatos no se logra identificar la señal de oxido- reducción correspondiente al hierro de la hemoglobina, por lo que no se podría usar este método para cuantificarla.



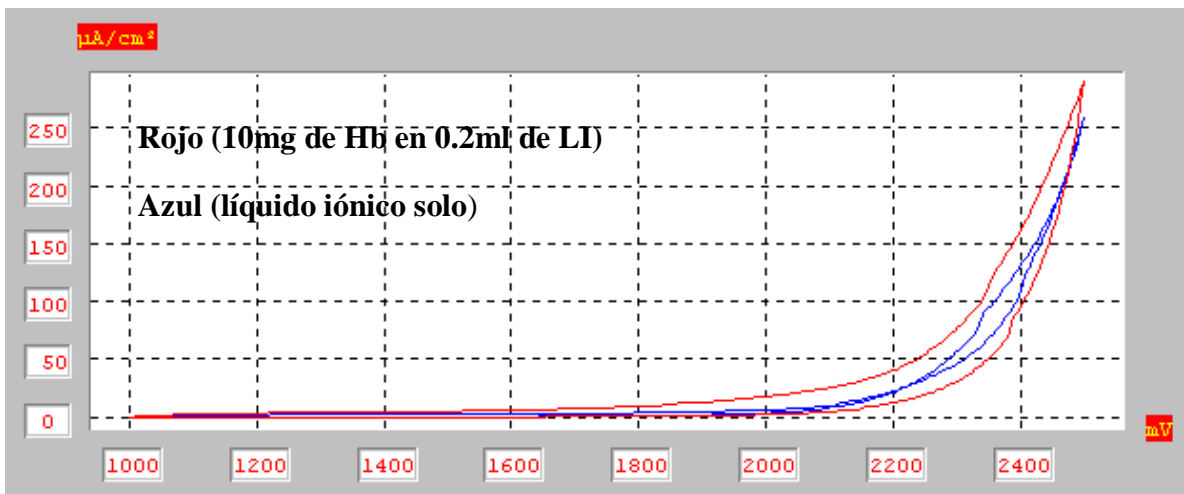
Grafica R9. Comportamiento de la hemoglobina disuelta en buffer fosfatos pH= 7 aplicada sobre electrodos serigrafiados DS-110



Grafica R10. Comportamiento de la hemoglobina disuelta en Líquido iónico aplicada sobre electrodos serigrafados de carbón DS-110

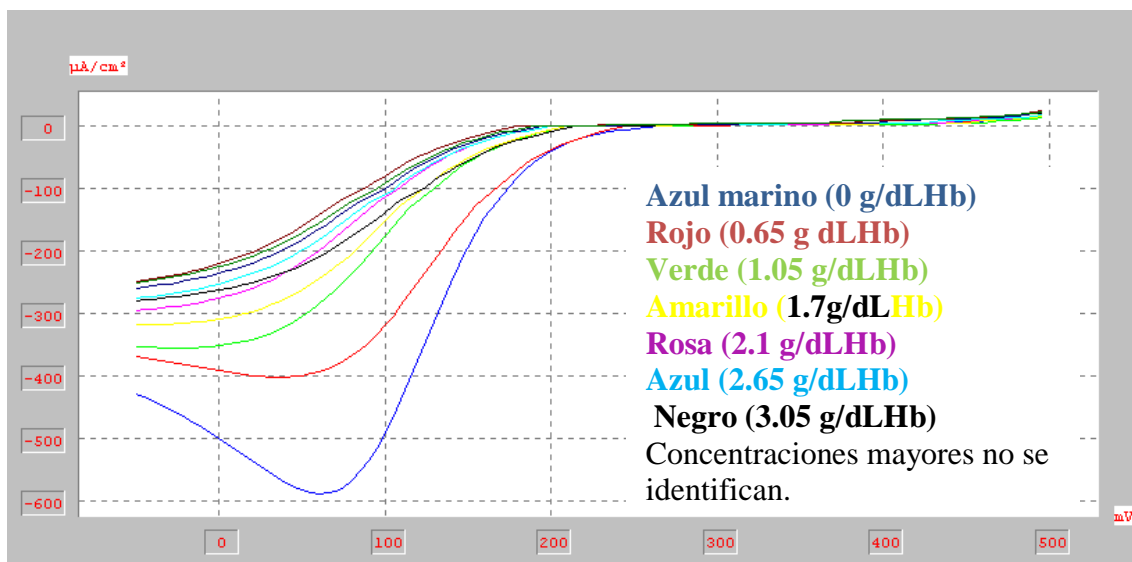
En la gráfica R10 El uso del electrodo serigrafado de carbón DS-110 mostro ser poco útil ya que éste es degradado por el líquido iónico, por lo que no se obtienen registros útiles.

Posteriormente al hacer el cambio de electrodo serigrafado de carbón DS-110 por el de platino (DS-550) ya no tuvimos problema con el degradado de los electrodos, pero a los potenciales ensayados no pudimos detectar a la hemoglobina. (Grafica R11)

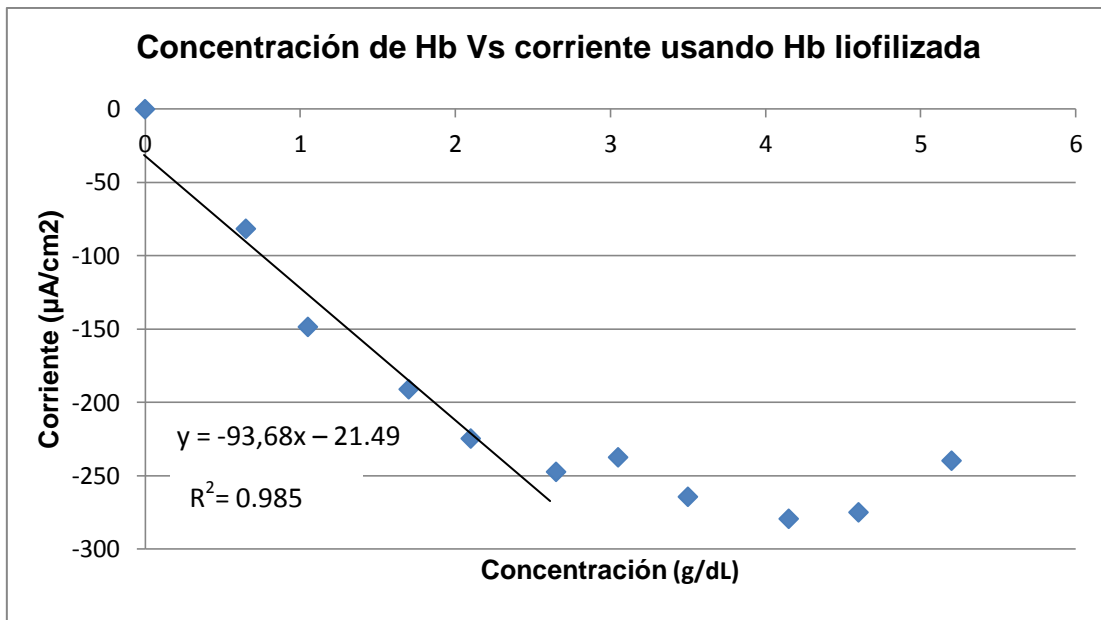


Grafica R11. Comportamiento de la hemoglobina disuelta en Líquido iónico aplicada sobre electrodos serigrafados de platino DS-550

La grafica R 12 muestra que a concentraciones de hemoglobina liofilizada de hasta 2.65 mg/dL si existe una relación indirectamente proporcional entre la concentración de Hb y la corriente generada. A medida que se incrementa la concentración de Hb la corriente es menos negativa. En concentraciones más altas hay un efecto de saturación que no genera la misma relación. La grafica R13 corrobora la relación lineal al graficar la diferencia de corriente (corriente generada por la solución de ferricianuro sin Hb menos la corriente producida por las diferentes soluciones de Hb) contra la concentración de Hb. Esta misma relación fue encontrada por *Ming-Song et al (2011)* al comparar la medición de la hemoglobina usando el biosensor electroquímico BeneCheck

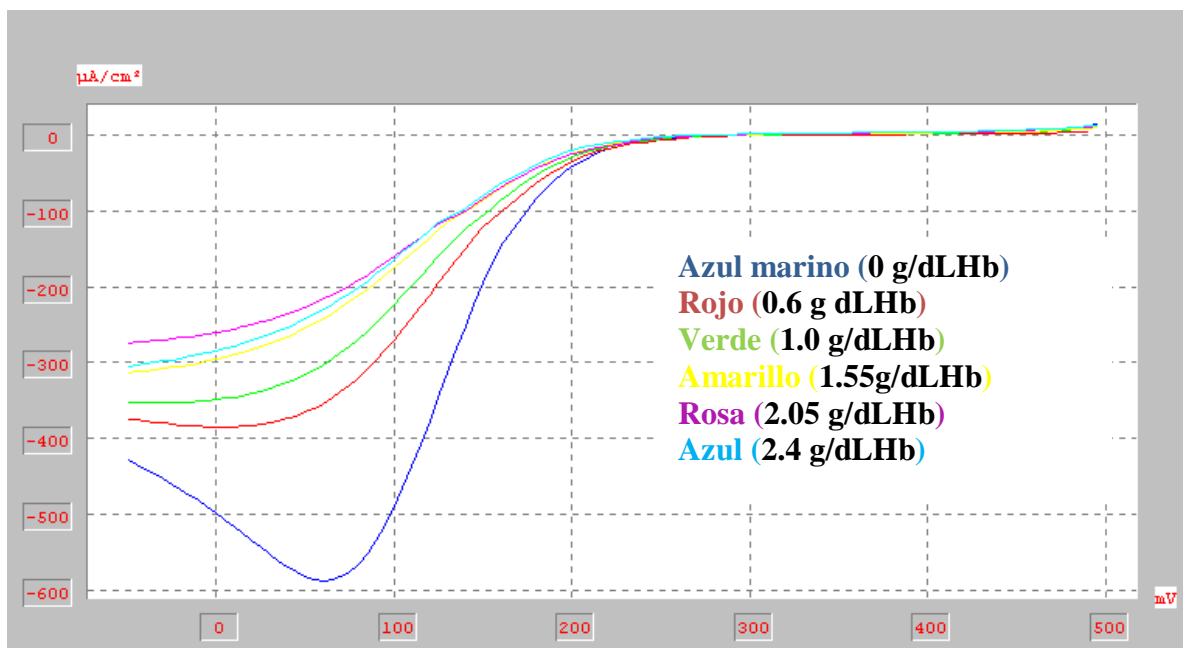


Grafica R12. Influencia de la concentración de Hb liofilizada (disuelta en solución de ferricianuro de potasio 0.1M en KNO_3 0.1M) sobre la corriente. Aplicada sobre electrodos serigrafiados de platino DS-550



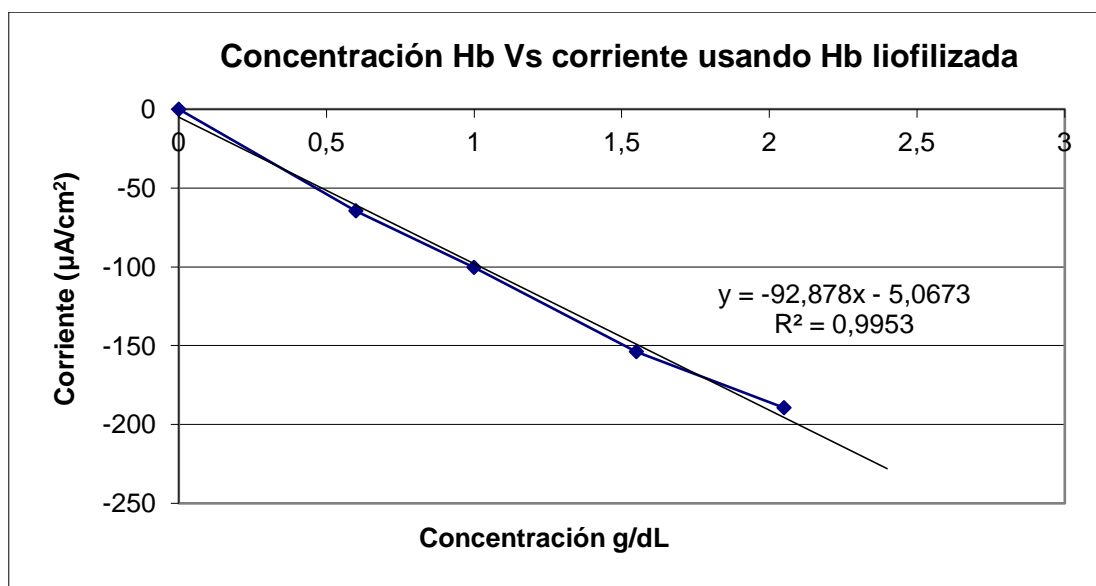
Grafica R13

Al repetir el experimento anterior aplicado las concentraciones bajas, donde tenemos una respuesta lineal respecto a corriente contra concentración de Hb (graficas 14 y 15), se confirma lo encontrado en los ensayos anteriores.



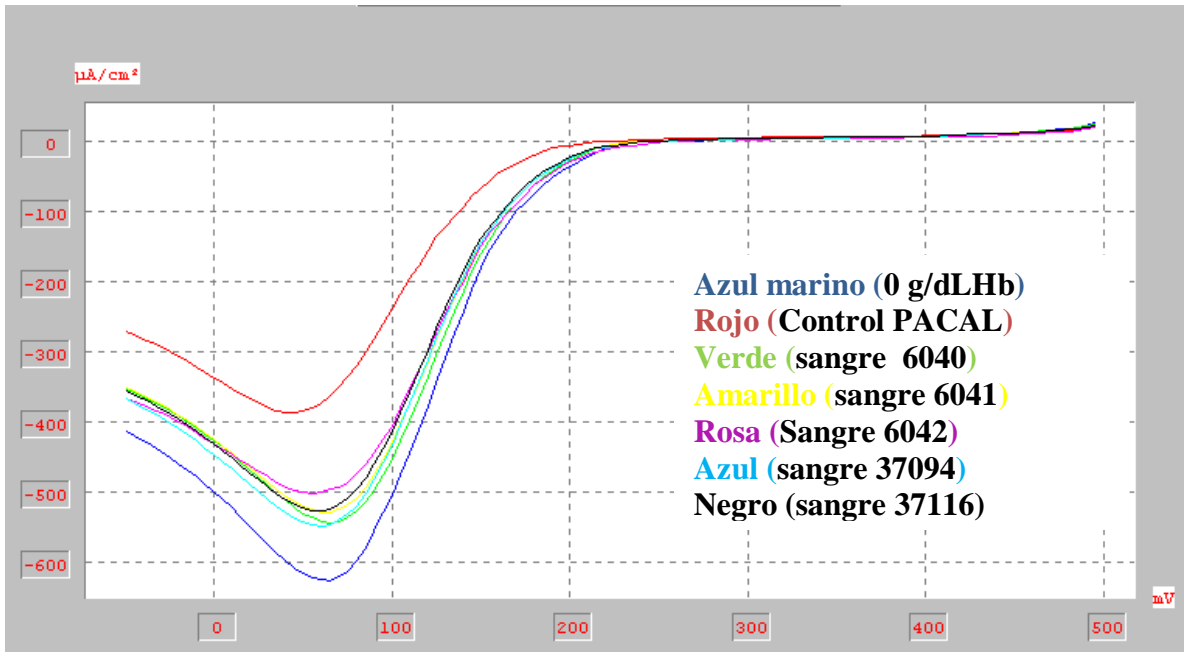
Grafica R14. Influencia de la concentración de Hb liofilizada sobre la corriente. Aplicada sobre electrodos serigrafados de platino DS-550

Al graficar la diferencia de corriente (corriente generada por la solución de ferricianuro sin Hb menos la corriente producida por las diferentes soluciones de Hb) contra la concentración de Hb se obtiene la siguiente grafica R15

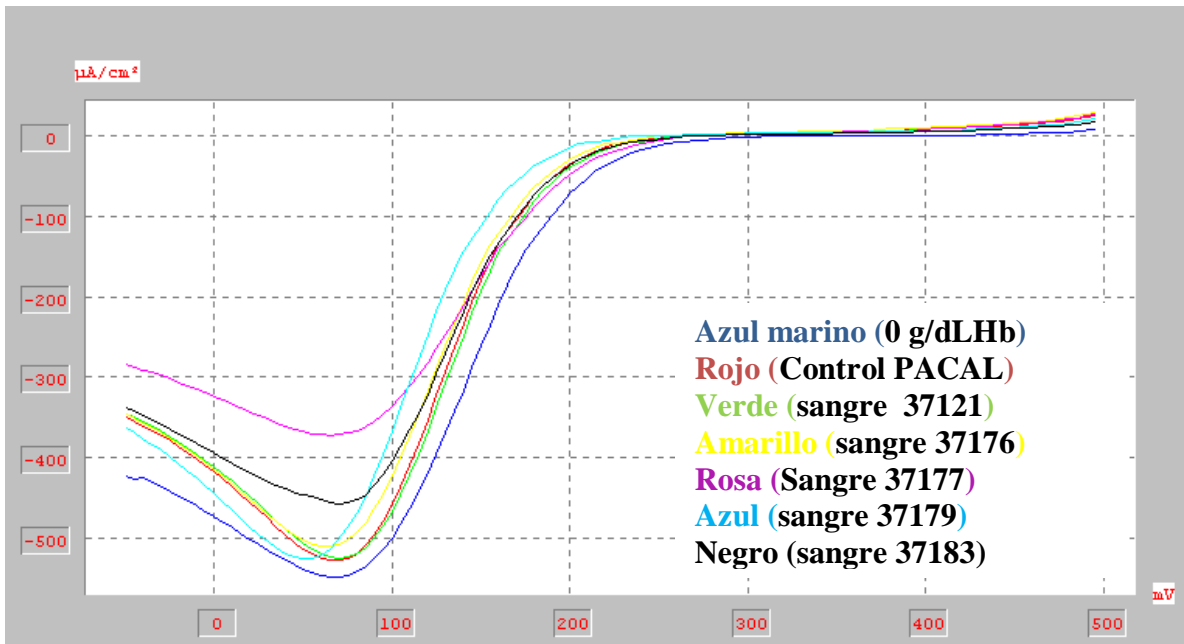


Grafica R15

Hasta aquí se ha trabajado solo hemoglobina liofilizada, pero esto no es útil en la práctica sino es aplicable a sangre total humana. Las siguientes pruebas corresponden a la aplicación del sistema 3 usando los electrodos SPE DS-550. Como puede observarse en la grafica R16 y R17 se puede observar una diferenciación entre las curvas correspondientes a muestras con sangre y sin sangre (azul marino) al tener un valor constante de 5.91 g/dL de hemoglobina en la sangre hemolizada control de PACAL pudimos relacionar la corriente generada por ésta y su comparación con las otras muestras generando así el cuadro R1



Gráfica R16. Corrimiento de pruebas con sangre total humana



Gráfica R17. Corrimiento de pruebas con sangre total humana

El cuadro R1 observamos los valores obtenidos de concentración de Hb por medio del equipo Sysmex (sexta columna) y su comparación con el calculado obtenido con el uso del SPE DS-550 (quinta columna) y en las últimas columnas a la derecha observamos las variaciones de los valores obtenidos por SPE respecto a los obtenidos con el equipo Sysmexal calcular la desviación estándar de la variación absoluta de los valores

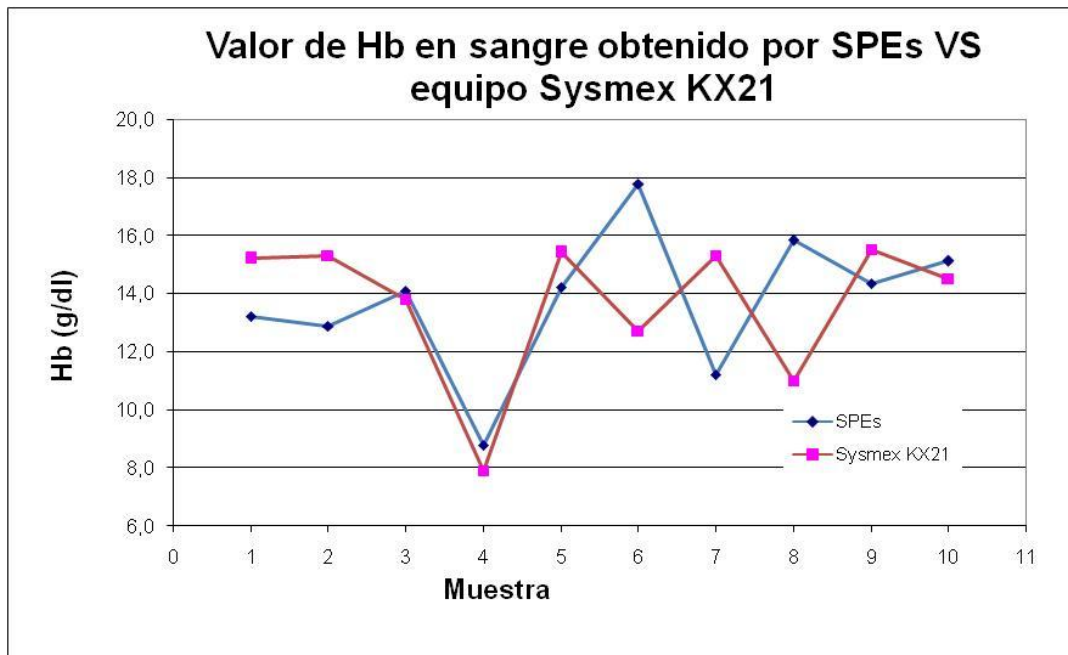
obtenidos al usar el SPE es de $S= 1.78$, al observar la grafica R18 está desviación se hace evidente. Si se calcula la variación porcentual puntual se obtiene una desviación máxima de 28.4% para la muestra T8.Obteniéndose de la siguiente manera; (Variación absoluta/valor de equipo sysmex) x 100, para T8 es $(5.07/17.8) \times 100$ con un mínimo de 2.1% para T5. Estas diferencias podrían deberse simplemente al método o bien a que en las muestras la hemoglobina no fue completamente liberada por una inadecuada lisis de los eritrocitos, ya que nosotros no consideramos necesaria la adición de un tensoactivo sino solamente se congelo y agito vigorosamente las muestras. En las soluciones Drabkin usadas en los equipos que utilizan el método fotométrico como lo es el caso del equipo Sysmex(Ming-Song *et al*, 2011) hacen uso de agentes lisantes al igual que en otros métodos amperométricos como el patentado por Venkat *et al* (2010)

Cuadro R1. Relación de los valores obtenidos de corriente a potencial impuesto y concentración de Hb en sangre total humana y su comparación con su valor Hb reportado en equipo sysmex

Muestra	Identificación	Corriente (0)potencial	Diferencia	Valor Hb Calculado (g/dL)	Valor Hb De equipo (SYSMEX) (g/dL)	Variación	variación absoluta
T1	blanco	-499	0	0			
T2	Control	-337,5	-161,5		5,91		
T3	6040	-426,8	-72,2	13,2	15,2	1,98	1,98
T4	6041	-424,9	-74,1	12,9	15,3	2,42	2,42
T5	6042	-431,3	-67,7	14,1	13,8	-0,30	0,3
T6	37094	-390,4	-108,6	8,8	7,9	-0,89	0,89
T7	37116	-431,9	-67,1	14,2	15,4	1,18	1,18
T8	37121	-445,3	-53,7	17,8	12,7	-5,07	5,07
T9	37176	-394,9	-79,1	11,2	15,3	4,10	4,1
T10	37177	-418	-56	15,8	11	-4,82	4,82
T11	37179	-412,2	-61,8	14,3	15,5	1,16	1,16
T12	37183	-415,4	-58,6	15,1	14,5	-0,62	0,62
						S	1.78

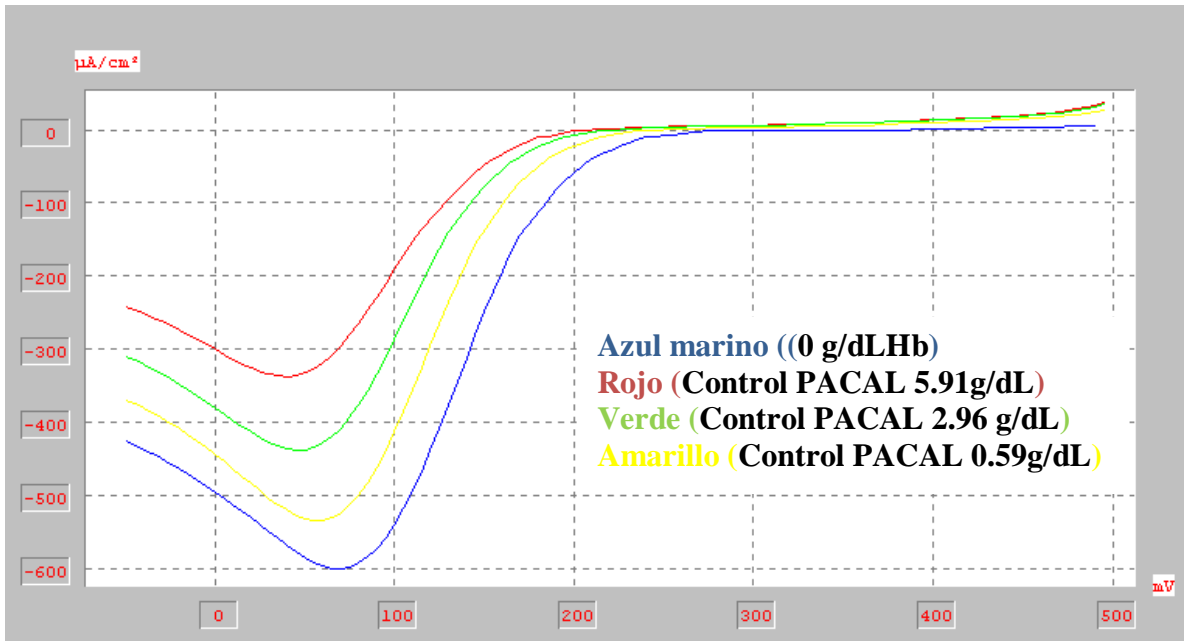
Se construyó la grafica comparativa entre los valores Hb calculados obtenidos por SPE y los valores obtenidos con el equipo Sysmex KX21 (mostrados en el cuadro R1). Se obtuvo Grafica R18. Las posibles causas de la desviación observadas en esta gráfica R18, no demeritan el trabajo realizado ya que comprueban que es posible la cuantificación de la hemoglobina en sangre total por voltamperometría en cantidades muy pequeñas y su posible aplicación en equipos portátiles como los BeneCheck(Ming-

Song et al 2011) sin el ánimo de emularlos sino de entender la tecnología mejorarla y aplicarla a nuestras necesidades

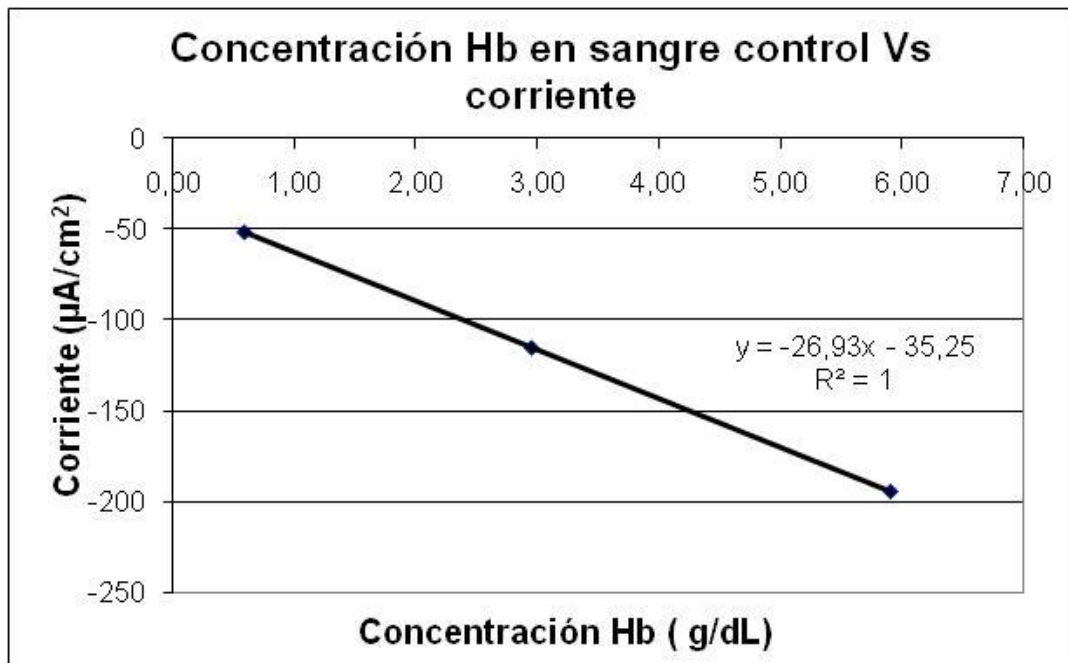


Grafica R18 Comparativo de la concentración de Hb en sangre total humana obtenido con SPEs con su valor Hb reportado en equipo sysmex

En la práctica un solo valor de referencia no es suficiente para poder determinar correctamente la concentración de un análisis clínico, para ello se usan controles altos, medios y bajos debido a la carencia de éstos se trabajó diluyendo el control, al hacer esto se obtuvo 3 concentraciones diferentes al someterlos al mismo tratamiento que las muestras anteriores se logró obtener la gráfica R19 en ella se observa una clara definición de las curvas con sangre y sin ella, se observa una relación inversamente proporcional de la concentración de Hb respecto a la corriente negativa. Esto es evidente en la gráfica R20 que muestra una perfecta relación lineal con un coeficiente de correlación R^2 de 1.



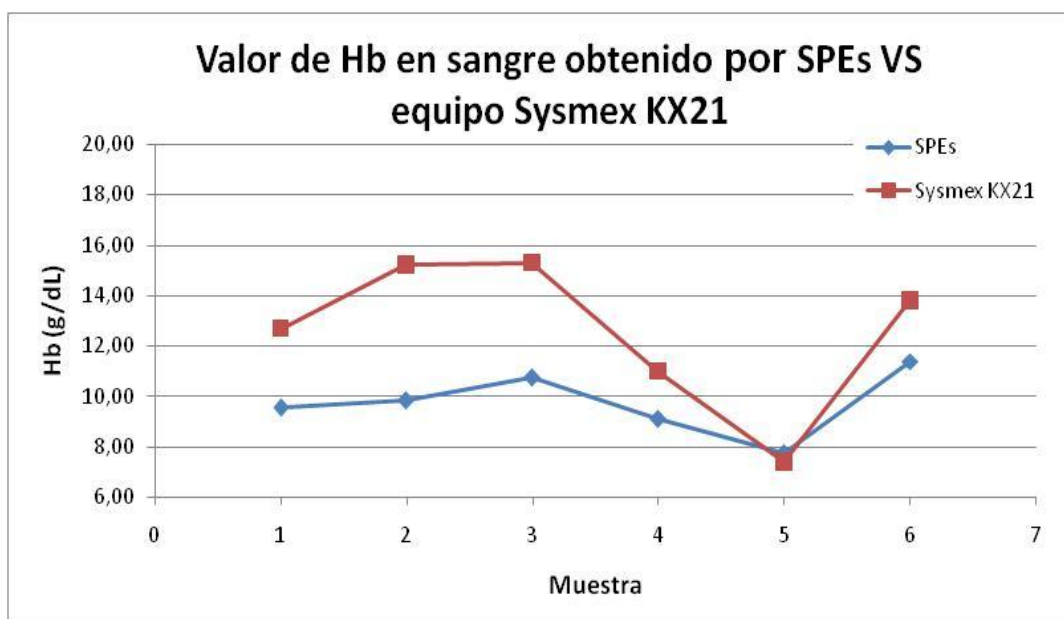
Gráfica R19. Relación de corriente y concentración de Hb en sangre hemolizada control de PACAL



Gráfica R20. Relación de los valores obtenidos de corriente a potencial impuesto y concentración de Hb en sangre hemolizada control de PACAL

Al haberse obtenido la relación lineal de concentración de Hb del control respecto a corriente (gráfica R20) se analizaron otras muestras y se obtuvo las concentraciones de Hb al correlacionar el valor de corriente generado en cada una de ellas con la gráfica

R20, obteniendo de esta manera la grafica R21 y sus correspondiente valores en la tabla R2, en ésta última al calcular la desviación estandar de la variación absoluta de los valores obtenidos por SPE respecto a los obtenidos por Sysmex se encontró que es de $S=1.81$ muy similar a la obtenida con las muestras anteriores que fue de $S=1.78$.



Grafica R21. Comparación del valor de Hb en sangre total obtenido por SPEs y el equipo Sysmex

Tabla R2. Valores de Hb obtenidos por SPEs y el equipo Sysmex

Muestra	Identificación	Corriente (0)potencial	diferencia	Valor Hb Calculado (g/dL)	Valor Hb De equipo (sysmex) (g/dL)	variación
U1	blanco	-494,6				
U2	Control	-300,2	-194,4	5,91		
U3	Control	-379,6	-115	2,96		
U4	Control	-443,5	-51,1	0,59		
U5	37121	-373,4	-121,2	9,57	12,7	-3.13
U6	6041	-370,9	-123,7	9,85	15,2	-5.35
U7	37176	-362,8	-131,8	10,75	15,3	-4.55
U8	37177	-377,7	-116,9	9,09	11	-1.91
U9	37094	-389,7	-104,9	7,76	7,4	0.36
U10	6042	-357	-137,6	11,40	13,8	-2.40

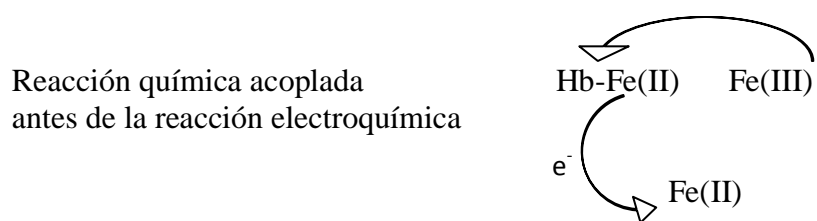
Por otra parte *Ming-Song et al (2011)* compararon la medición de hemoglobina usando el biosensor electroquímico BeneCheck (General Life Biotechnology Co., Ltd, Taipéi,

Taiwán) y el método tradicional óptico (adaptaciones del método Drabkin) usado en los equipos Sysmex, CoulterBeckman, CellDyn y los métodos de HemoCue. Se monitorearon los efectos en muestras de sangre venosa fresca, hemolizada y adicionadas con bilirrubina para evaluar su interferencia, También se hicieron 6 pruebas consecutivas con sangre capilar obtenida de los dedos de 9 voluntarios las cuales se evaluaron con el biosensor BeneCheck. Se determinó la repetibilidad, precisión y exactitud de ambos métodos.

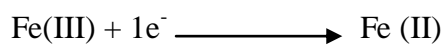
Las muestras hemolizadas, y las muestras que contienen la bilirrubina a una concentración de hasta 150 mg /L no mostraron ningún efecto interferente en los estudios. La repetibilidad de las pruebas de sangre del dedo verificada con seis pruebas consecutivas de los nueve voluntarios, tuvo una variación de entre 3% y 8%. Los resultados del ensayo de BeneCheck se correlacionaron con Sysmex, CoulterBeckman, CellDyn y los métodos de HemoCue. Los resultados demostraron una similitud en el 95% de los ensayos con una desviación de $\pm 15\%$. Concluyeron que el sistema BeneCheck para medir hemoglobina presenta un buen desempeño en precisión, con 1 μL de sangre y un tiempo de detección de 10s. Con base en el costo del equipo BeneCheck, la precisión, el volumen de la muestra, la medición del tiempo, la facilidad y la portabilidad, BeneCheck puede ofrecer las mejores características para estos fines. Los resultados de este estudio demuestran que es posible estandarizar las técnicas potencioamperométricas para la determinación de hemoglobina en sangre utilizando los electrodos serigrafados y que comparado con los resultados obtenidos en este trabajo, los valores obtenidos son equiparables con los equipos automatizados como el Sysmex.

El mecanismo posible para explicar el comportamiento del sistema ferricianuro de potasio hemoglobina es el siguiente: El Fe^{II} unido a la hemoglobina ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Hb}$) induce la reducción del Fe^{III} del ferricianuro de potasio a Fe^{II} generando un complejo hemoglobina y ferricianuro oxidado $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-Hb}]\text{-}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$. Debido a la transferencia de los electrones del ferricianuro de potasio se genera una corriente.

La intensidad de la corriente generada es proporcional a la concentración del ferricianuro de potasio restante sobre la superficie del electrodo e inversamente proporcional a la concentración de hemoglobina en la muestra de sangre, esquemáticamente sería:



Reacción electroquímica: $\uparrow i \propto [\text{Fe(CN)}_6]^{3-}$



Generando $[\text{Fe(CN)}_6]^{4-}$

*“Si no estás preparado para morir por ella,
saca la palabra “libertad” de tu vocabulario.”*

*El-HajjMalik El-Shabazz(Malcom X)
(1925-1965)*

5. CONCLUSIONES

Se logró la construcción de las microceldas con los electrodos de pasta de carbón y la aplicación del líquido iónico [emim][BF₄]. Se obtuvo la cuantificación del ferroceno con los electrodos de pasta de carbón pero no se obtuvieron resultados satisfactorios para la medición de hemoglobina liofilizada. En cuanto al uso de líquido iónico, aplicando el sistema de electrodos tradicional en medio homogéneo, se obtuvo una correlación directa entre la concentración de hemoglobina liofilizada y la corriente aunque los resultados no fueron reproducibles.

Se logró obtener los parámetros potencioamperométricos que permitieron la medición cuantitativa de la hemoglobina con muestras de sangre de 10 μ L diluida en la mezcla de 0.1M de ferricianuro de potasio y 0.1M de KNO₃ y aplicándola sobre los electrodos serigrafiados DS-550. Los valores obtenidos fueron comparables a los reportados en el equipo Sysmex KX21

No se logró cuantificar la hemoglobina con electrodos serigrafiados de carbón DS-110.

“Es más fácil destruir un átomo que un prejuicio”

Albert Einstein (1879-1955)

6. EXPECTATIVAS

Éste trabajo solo una pequeña aproximación que puede servir como el preámbulo para el desarrollo de electrodos serigrafiados en el laboratorio. Para lo cual se debe trabajar en los procesos para la impresión de los electrodos, trabajar en el desarrollo de los mediadores para la medición de otros componentes que contengan elementos susceptibles a un proceso de oxido-reducción como citocromos y algunas vitaminas como la cianocobalamina, por mencionar algunos.

Para el caso específico de la hemoglobina se recomienda validar la metodología de uso de los electrodos serigrafiados DS-550 para poder definir límites de detección, cuantificación, precisión, exactitud, selectividad/especificidad, reproducibilidad, incertidumbre, entre otros. Se sugiere trabajar en la determinación de hemoglobina glucosilada.

*“Si buscas resultados distintos,
no hagas siempre lo mismo”*

Albert Einstein (1879-1955)

7. BIBLIOGRAFIA

- 1) Alors C. R. (2008). “Determinación de hemoglobina en el laboratorio” Revista Digital. 03 Baeza R. A; García M. A. de J. (2011). “Principios de electroquímica analítica”; UNAM. México.
- 2) Bard, Allen J., y Larry R. Faulkner. (2000). “Electrochemical methods Fundamentals and applications”; 2a.ed.WILLEY.U.S.A
- 3) Drabkin, D. L. Austin, J. H. JJ. (1935).“Spectrophotometric studies: II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin”,Biol. Chem. 112: 51-65.
- 4) DropSens (2012): <http://www.dropsens.com/> (Revisión mayo 2012)
- 5) Emsley, John. (2012). ISI Web of Knowledge. 2003: http://archive.sciencewatch.com/sept-oct2003/sw_septoct2003_page7.htm. (Revisión enero 2012)
- 6) Fogg, Arnold G. y Wang, Joseph (1999).“Terminology and convention for electrochemical stripping analysis (Technical Report)”. Pure Appl. Chem. 71, 5: 891-897.
- 7) Fry, Albert. (2003). “Strong ion-pairing effects in a Room Temperature Ionic Liquid”. J. Electroanal. Chem. 546: 35-39.
- 8) Fernández M. C. (1996).“Desarrollo de electrodos compositos de base grafito como electrodos voltamperométricos y detectores electroquímicos en FIA y HPLC” Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Químicas, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE, España.
- 9) García M. A de J (2011)“Estudio electroanalítico de ferroceno y p-benzoquinona bajo la influencia del nivel de acidez en cinco líquidos iónicos”; Tesis de maestría UNAM. México.

- 10) González G. M. B; García C. A.(2011)“Los biosensores electroquímicos: herramientas de la analítica y el diagnóstico clínico”: www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/1068/1065(revisión diciembre 2011)
- 11) Guan-Chao Zhao, Miao-QuingXu, Juan Ma. and Xian-Wen Ewi (2007).“Electrochemistry communications”. 9:920-924
- 12) Guo-Xian Ma, Tian-hong Lu and Yong-Yao Xia (2007). “Bioelectrochemistry”.71:180-185
- 13) Hapiot, Philippe, y Corinne Lagrost. (2008) “Electrochemical Reactivity in Room-Temperature Ionic Liquids”. Chem. Rev. 108: 2238–2264
- 14). Hart P. J. (1997) “Recent developments in the design and application of screen-printed electrochemical sensors for biomedical, environmental and industrial analyses”TrAC Trends in Analytical Chemistry. 16, 2: 89-103
- 15) Johnson, Keith E. (2007) “What’s an Ionic Liquid?” The Electrochem. Soc., Interface Spring. U.S.A.
- 16) Kotrly, S., y L. Šůcha. (1985) “Chemical Equilibria in Analytical Chemistry”; 1a Ed. JOHN WILLEY& SONS, New York
- 17) Matsumotoen, H. (2005) “Electrochemical aspects of ionic liquids”; JOHN WILLEY& SONS, New York.
- 18) McKee T. and McKJee. “Bioquímica. La base molecular de la vida” (2003) McGraw Hill INTERAMERICANA.
- 19) Ming-Song Hsieh , Tai-Guang Wu, Chein-Shyong Su , Wen-Jing Cheng , NamikOzbek,Kun-Yuan Tsai , Ching-Yu Lin; (2011) “Comparison of an electrochemical biosensor with optical devices for hemoglobin measurement in human whole blood samples”.ClinicalChemicalAct. 412: 2150-2156
- 20) Nishida, T., Y. Tashiro, y M. Yamamoto. J. (2003) FluorineChem. 120: 135-141.
- 21) Palomo G, Ivan; Peralta G. Jaime; Palma B. Julia. (2005) “Hematología Fisiopatología y diagnóstico”; E.BOOK. Universidad de Talca España.
- 22) Pesee J. A; Kaplan A. A (1990) “Química clínica. Métodos” PANAMERICANA, Argentina.

- 23) Schröder, Uwe; Joy, D.; “Compton, Richard G.; Morken, F.; Suarez, Paulo; Corsarty, Crestina; Sauza, Roberto y Dupont, Jairtan. (2000) “Waterinduced accelerated ion diffusion: voltammetric studies in 1-methyl-3-[2,6-(S)-dimethylocten-2-yl]-imidazolium tetrakisfluoroborate, 1-butyl-3-methylimidazolium tetrakisfluoroborate and hexafluorophosphate ionic liquids”. *New J. Chem.* 24: 1009-1015.
- 24) Sigma-Aldrich (R). (2005) “Chem Files - Ionic Liquids”. 5, 6. SIGMA-ALDRICH (R). U.S.A.
- 25) Sigma-Aldrich (R). (2011) 1-Ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate. s.f. (04365):
http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=es&N4=04365|FLUKA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC(Revisión Marzo 2011).
- 26) Stadle, W. C(1920) *Biol. Chem.*, 41:237
- 27) Venkat Manohar; George Varghese; Yegnaraman Venkatraman; Phani Lakshminarasimha Kanala; Mathiyarasu Jayaraman. (2010) “Non-enzymatic electrochemical method for simultaneous determination of total hemoglobin and glycated hemoglobin” Patent India. (20100089774; 04,15,2010).
- 28) Xiao, Li, y Keith Johnson. (2003) “Electrochemistry of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ionic liquid.”. *J. Electrochem. Soc.* 150, 6: E307-E311.
- 29) Waddington, T. C. (1989) “Non-aqueous Solvents”; DORON AURBACH. USA
- 30) World Health Organization. (1984) “Recommended method for the determination of the hemoglobin content of blood”; WHO. Geneva.
- 31) www.unizar.es (2011): www.unizar.es/departamentos/bioquimica.../09-%20Biosensores (revisión diciembre 2011)