

Construcción y caracterización de un sensor electroquímico de interés médico y farmacológico

S. MENOLASINA, M. OLARTE, S. BARRETO, L. DÍAZ

*Laboratorio de Análisis Instrumental, Departamento de Análisis y Control
Facultad de Farmacia, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela*

RESUMEN

La necesidad en la detección de elementos trazas en los fluidos biológicos y en determinados medicamentos ha incrementado la demanda de técnicas cada vez más sensibles y selectivas para tal fin. En la actualidad, se requiere de técnicas de análisis que además de ser sensibles y selectivas abaraten el costo del análisis clínico. La técnica electroquímica de Voltametría de Redisolución Anódica (VRA) ha mostrado ser una técnica bastante adecuada para este propósito, si se utilizan sensores electroquímicos específicos. Iones metálicos como Pb^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} presentes en muestras de orina y semen previamente pretratadas, así como, iones Pb^{2+} y Cu^{2+} en preparaciones farmacéuticas fueron detectados simultáneamente utilizando la técnica VRA con un sensor electroquímico construido de carbón vítreo y modificado electroquímicamente con una película delgada de mercurio en el laboratorio.

PALABRAS CLAVE

Sensor electroquímico, Voltametría de Redisolución Anódica.

ABSTRACT

The need for monitoring trace elements in biological materials has led to an increasing demand for suitably sensitive and selective analytical techniques. For this purpose analytical techniques that require relatively inexpensive instrumentation are needed. The anodic stripping voltammetric technique has shown to be suitable when specific electrochemical sensors are used. Metallic ions such as Pb^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} present in urine and semen samples, as well as Pb^{2+} and Cu^{2+} ions from pharmaceutical preparations were detected simultaneously by anodic stripping voltammetry (ASV) and using a glassy carbon electrode built and modified with a fine mercury film as electrochemical sensor.

INTRODUCCIÓN

La técnica de Voltametría de Redisolución Anódica (VRA) es una de las técnicas electroquímicas que permite un alto grado de sensibilidad en la detección de elementos trazas en fluidos biológicos y preparaciones farmacéuticas. El uso de VRA permite determinar concentraciones muy bajas, del orden de partes por billón (ppb) [1,2]. Esta técnica se basa prácticamente en dos etapas, una de preconcentración del material que se desea analizar sobre la superficie del electrodo de trabajo y otra de redisolución del material preconcentrado por la aplicación de un barrido inverso de potencial. El grado de sensibilidad que se obtiene por VRA, depende de la señal de excitación que se le aplique al electrodo de trabajo y del tipo de electrodo que se utilice como electrodo de trabajo [3,4]. La alta sensibilidad que se observa cuando se emplea la VRA es atribuida a la etapa de preconcentración (etapa de electrodeposición a potencial constante) que se realiza en la superficie del electrodo de trabajo. Es por ello que el tipo de electrodo de trabajo que se utilice con la técnica VRA influirá en la sensibilidad del análisis.

Para que la etapa de preconcentración sea efectiva, el material depositado debe adherirse muy bien a la superficie del electrodo. El electrodo de trabajo ideal a ser utilizado en la detección de trazas de elementos en fluidos biológicos y preparados farmacéuticos debe ser uno que tenga una superficie reproducible y una corriente residual baja. El electrodo de goteo de mercurio es considerado el más apropiado para la etapa de reducción de iones metálicos, como etapa de preconcentración, por ofrecer una mejor ventana de potencial para trabajar en medio acuoso. Sin embargo de acuerdo a una gran variedad de estudios realizados con diferentes tipos de electrodos [5-8], los electrodos de oro, platino, carbón vítreo y de pasta de carbón han demostrado poseer dichas cualidades y han sido usados exitosamente. A pesar de su buena sensibilidad, estos electrodos pueden ser utilizados

exitosamente para el análisis de una sola especie electroactiva. Cuando estos electrodos se utilizan para el análisis simultáneo de varias especies electroactivas presentes en una misma muestra es imposible obtener la homogeneidad requerida de los materiales depositados, antes de llevarse a cabo la etapa de redisolución de la superficie del electrodo. Para solventar este problema se suele utilizar electrodos sólidos modificados con una delgada película de mercurio.

En los últimos años, muchos esfuerzos se han dedicado a la construcción de sensores electroquímicos utilizando como material de base el carbón por ser este un material muy versátil, barato, de estructura superficial reproducible, amplio intervalo de potencial anódico de trabajo, de baja resistencia eléctrica y baja corriente residual, así como, por su diversa morfología, lo que lo hace útil para diferentes aplicaciones electroquímicas, como por ejemplo: fibra de carbón [5], carbón vítreo [9], pasta de grafito [10-12], compositos [13] y películas de carbón [14].

El carbón vítreo ha mostrado ser uno de los materiales más utilizados en la preparación de electrodos modificados con películas delgadas de mercurio en estudios por VRA [9], debido a que este tipo de sensor electroquímico exhibe un alto grado de sensibilidad ya que solamente una cantidad extremadamente pequeña de mercurio es incorporada dentro de la película que se adsorbe sobre la superficie de carbón vítreo, resultando en la formación de una amalgama muy concentrada durante la etapa de deposición. Este comportamiento fisicoquímico permite su uso en la detección simultánea de varias especies electroactivas presentes en una misma muestra. Los picos de corriente que son obtenidos en los voltamogramas por VRA utilizando electrodos de carbón vítreo modificados con delgadas películas de mercurio tienden a ser agudos y bien definidos. En los fluidos biológicos existe una variedad de sustancias esenciales y tóxicas cuyos niveles de concentración son de gran interés para el médico en el diagnóstico y tratamientos de enfermedades. Entre estas sustancias se encuentran iones tales como Pb^{2+} y Cd^{2+} cuyos niveles de concentración pueden ser tóxicos en el organismo afectando la química de ciertos fluidos fisiológicos [15] y otros como Cu^{2+} y Zn^{2+} cuyos niveles de concentración pueden ser esenciales en ciertos procesos metabólicos, entre ellos el metabolismo óseo [16]. Se considera que el Cobre y el Zinc están involucrados en la producción y estabilización de las moléculas de colágeno, el cual es la proteína que mayoritariamente constituye la estructura ósea, así como de los cartílagos, piel y tendones. Por otro lado se ha encontrado altas concentraciones de Zinc en el

sistema reproductor masculino, observándose que este metal desempeña un papel importante en la fisiología reproductiva del hombre, lo que ha conducido a que muchos investigadores [17,18] hayan sugerido la existencia de una relación entre los niveles de Zinc en el semen humano y la infertilidad masculina.

Se conoce que la deficiencia de cierto tipo de vitaminas en el organismo aumenta la absorción en el hueso de ciertos metales pesados como el Plomo, el cual en concentraciones elevadas es perjudicial para la salud. Todos estos iones son oxidados en un intervalo de potencial donde el medio electrolítico (sangre, orina o semen) no es descompuesto. Además, tienen la habilidad de formar complejos insolubles con mercurio.

La determinación simultánea de la concentración de estos metales, Zn^{2+} , Cu^{2+} y Pb^{2+} presentes en fluidos biológicos como la sangre y la orina es de suma importancia en el estudio del proceso de remodelación ósea, cuyas alteraciones pueden conllevar a enfermedades tales como la Osteoporosis.

La determinación de Pb^{2+} en suplementos dietéticos ricos en calcio permitiría conocer si la población que consume estos preparados farmacéuticos está en riesgo de contaminación por plomo.

La determinación de Zn^{2+} en plasma seminal en pacientes con y sin infertilidad pudiera aportar más información acerca del papel que juega la concentración de este metal en la fisiología reproductiva del hombre.

En el presente trabajo se fabricó y caracterizó electroquímicamente un electrodo de carbón vítreo y se modificó electroquímicamente con mercurio para ser utilizado como un sensor electroquímico de iones Zn^{2+} , Cu^{2+} y Pb^{2+} en fluidos biológicos y preparados farmacéuticos con la finalidad de investigar si dicho sensor electroquímico responde a la presencia de elementos trazas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todo el material de vidrio fue lavado inicialmente con detergente y abundante agua desionizada, posteriormente fueron dejados en remojo con HNO_3 concentrado durante 24 horas y finalmente vueltos a lavar con abundante agua desionizada (18 M Ω).

Reactivos y muestras

Todos los reactivos utilizados fueron de marca comercial RDH, de grado analítico y sin ningún tratamiento adicional de purificación. Soluciones stock de iones metálicos de Zn^{2+} , Cu^{2+} y Pb^{2+} fueron preparadas a partir de sus sales de nitrato, las cuales

fueron secadas a 100°C por dos horas y enfriadas antes de su utilización en la preparación de las mismas. Estas soluciones fueron preparadas y estabilizadas con pequeñas cantidades de HNO₃ 14M y diluidas con agua desionizada hasta un volumen de 50 ml

La recolección de las muestras de semen se realizó siguiendo una serie de normas y pasos necesarios para una buena toma de la muestra. El plasma seminal se separo de los espermatozoides y de los otros elementos que están presentes en el líquido espermático.

Electrodos

El sensor electroquímico se construyó utilizando un disco de carbón vítreo, el cual fue insertado en el extremo de un tubo de vidrio, de tal manera de quedar bien ajustado. El disco de carbón vítreo fue luego pulido hasta superficie espejo utilizando una suspensión de polvo de alúmina 0,3 y 0,005 mm (LECO® CORPORATION) en agua desionizada.

Por el extremo opuesto del tubo donde se había insertado el disco de carbón vítreo se adicionó mercurio líquido y se le introdujo un alambre níquelado (LEYBOLD-HERAESUS, 0,2 mm², 0,5f), de aproximadamente 30 cm de longitud, sumergiéndolo dentro del depósito de mercurio de tal manera que hiciera contacto con este. La función del alambre de níquel es la de conducir la corriente originada en la celda electroquímica hacia el potencióstato. Una vez asegurado el contacto eléctrico entre el alambre de níquel y el deposito de mercurio se procedió a sellar el extremo por donde se introdujo el alambre de níquel con un pegamento plástico (Epoxi 5-Minutos DEVCON®), dejando secar dicho pegamento por 24 horas.

La caracterización del sensor electroquímico fue hecha por Voltametría Cíclica utilizando una celda de vidrio de un compartimento y tres electrodos, el sensor electroquímico, un electrodo de calomel (electrodo de referencia) y un alambre de platino (electrodo secundario o contraelectrodo). La celda electroquímica fue acoplada al analizador electroquímico AUTOLAB.

La electrodeposición de la película de mercurio sobre la superficie del disco de carbón vítreo fue llevada a cabo *in situ* en la celda electroquímica, al mismo tiempo que se preconcentraba el Zinc, plomo y cobre por reducción de sus iones presentes en la solución de la muestra previamente tratada. Se utilizó un electrodo de calomel saturado como electrodo de referencia (ECS).

Una serie de experimentos fue realizada variando el potencial de electrodeposición, el tiempo de electrodeposición, el pH de la solución, con la finalidad de obtener las condiciones óptimas para la formación de una película estable y reproducible en cuanto a

espesor y homogeneidad.

Antes de comenzar a realizar cualquier experimento, se hizo pasar gas Nitrógeno a través de la solución electrolítica durante 10 min con la finalidad de mantener a la solución libre de oxígeno, ya que la presencia de éste puede afectar la calidad de la película de mercurio electrodepositada por la formación de óxidos, haciéndola menos sensible e inestable en la etapa de preconcentración de los iones metálicos durante el proceso de reducción electroquímica.

Discusión de Resultados

Las **figuras 1 y 2** muestran las familias de voltamogramas obtenidos realizando barridos de potencial catódico y anódico respectivamente en un medio electrolito determinado, utilizando el sensor electroquímico que se construyó en el laboratorio. Estos voltamogramas representan la respuesta electroquímica del sensor y permiten la caracterización del mismo. El comportamiento electroquímico observado y la forma de dichos voltamogramas al variar el potencial tanto en la dirección catódica como en la anódica es característico de la respuesta electroquímica que se debe observar al utilizar un electrodo de disco de carbón vítreo que esta bien construido y presenta buena conductividad eléctrica.

Las **figuras 3 y 4** muestran los voltamogramas obtenidos por la técnica de VRA de la oxidación electroquímica de varios metales preconcentrados por reducción en la superficie de un electrodo de carbón de construcción propia, modificado previamente con una película de mercurio al aplicar -1,25V durante 180 s. En ellos se aprecia la aparición de varios picos en el intervalo de potencial estudiado (-1,2 a 0V vs. SCE).

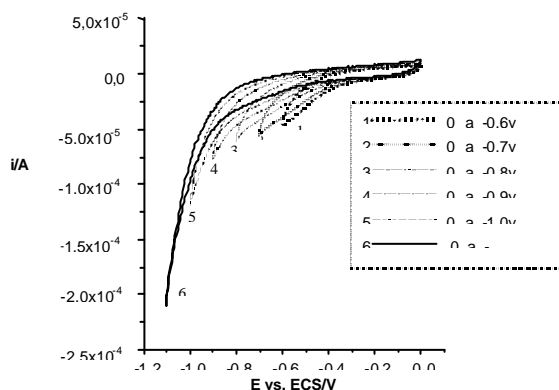


Figura 1. Respuesta del electrodo de carbón vítreo durante barridos voltamétricos en la dirección catódica a diferentes ventanas de potencial en una solución 0,1 M en HNO₃ a 100 mVs⁻¹.

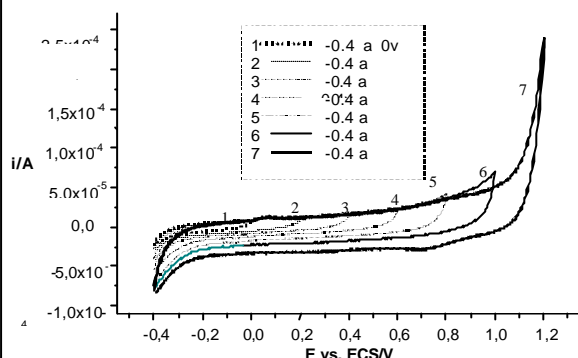


Figura 2. Respuesta del electrodo de carbón vítreo durante barridos voltamétricos en la dirección anódica a diferentes ventanas de potencial en una solución 0,1 M en HNO₃ a 100 mVs⁻¹.

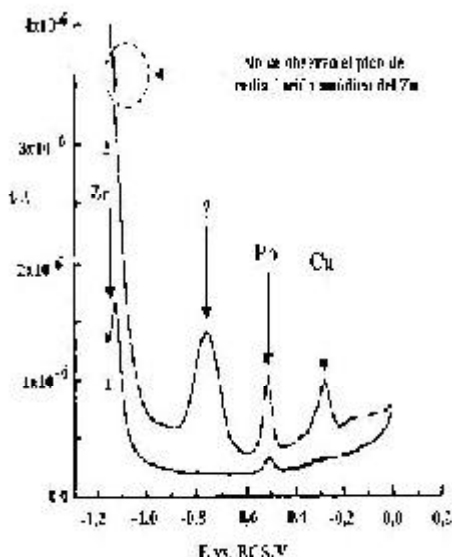


Figura 3. Voltamogramas obtenidos utilizando la técnica VRA: 1. Solución blanco HCl 5x10⁻³ mol dm⁻³; 2. Muestra de orina (5 ml) pretratada en medio ácido.

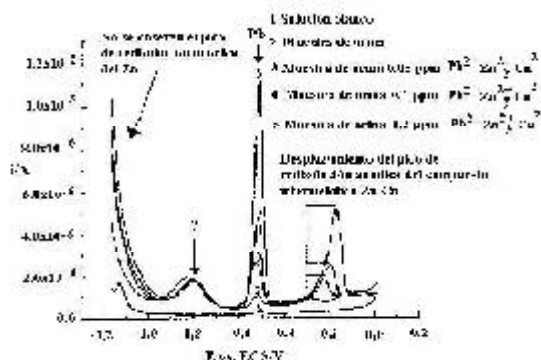


Figura 4. Representación simultánea de varios voltamogramas obtenidos utilizando la técnica VRA después de adicionar a una muestra de orina pretratada en medio ácido soluciones patrones de Zn²⁺, Pb²⁺ y Cu²⁺.

Estos picos son los picos de corriente de despojo anódico de los metales depositados previamente y que están siendo oxidados a sus formas M²⁺.

La curva 1 de la **figura 3**, representa el comportamiento de una solución electrolítica utilizada como blanco, la cual consiste de la misma solución que se utiliza para disolver el residuo que se obtiene una vez digerida la muestra de orina en HNO₃ conc. hasta sequedad completa. En esta curva se ve claramente el pico de redisolución anódica del Zn a -1,1V, el pico de redisolución anódica del Pb a -0,5V, más no el pico correspondiente a la redisolución anódica del Cu el cual debe ser observado en -0,3V vs. SCE. La curva 2 de la **figura 3** representa el comportamiento electroquímico de una muestra de orina digerida en medio ácido, en ella no se observa claramente el pico de redisolución anódica del Zn a -1,1V observado en la curva 1, mientras que sí se observa claramente los picos de redisolución anódica de una especie no identificada todavía a -0,8V, la del Pb a -0,5V y la del Cu a -0,3V. En esta curva se observa además unas pequeñas ondas no muy bien definidas entre -0,3 y -0,2V vs. SC. Al analizar diversas muestras de orina se obtuvo el mismo comportamiento. En la **figura 4** se muestra una familia de curvas obtenidas por adiciones sucesivas de una solución patrón de Zn²⁺, Pb²⁺ y el Cu²⁺ a una muestra de orina previamente pretratada en medio ácido. Se observó que el pico de redisolución anódica del Cu²⁺ comienza a desplazarse hacia potenciales más positivos a medida que la concentración de Zn²⁺ y Cu²⁺ es aumentada. Este comportamiento, junto con el hecho de que el pico de redisolución anódica del Zn²⁺ a -1,1V no se observa en presencia de iones Cu²⁺ tiene su explicación si se considera la formación de un compuesto intermetálico entre el Cu y el Zn en la película de mercurio, el cual no tiene una composición definida, y está siendo redisolto de la película de mercurio entre -0,3 y -0,1V.

En la **figura 5** se muestra la familia de voltamogramas obtenidos por VRA al adicionar sucesivamente una solución patrón de Zn²⁺ a una muestra de líquido seminal previamente pretratada en medio ácido. Se observó que el pico de corriente de redisolución anódica a -1,7V vs. ECS correspondiente a la oxidación de Zn a Zn²⁺ está bien definido y que a medida que se añade una cantidad determinada de solución patrón de Zn²⁺, la altura del pico de corriente de redisolución anódica se incrementa, siendo proporcional al aumento en concentración de Zn²⁺ en la celda electroquímica debido a la adición sucesiva de una solución patrón en este ion. Este comportamiento muestra que el sensor electroquímico construido en nuestro laboratorio una vez modificado con una delgada capa de mercurio bajo ciertas condiciones experimentales es bastante sensible a cambios de

concentración en iones Zn^{2+} . La estabilidad y definición de este pico de corriente de redisolución anódica del Zn a Zn^{2+} , depende del pH en la celda electroquímica, así como del potencial y tiempo de electrodeposición aplicado al electrodo de carbón construido. Actualmente se están realizando otros trabajos para optimizar las condiciones de trabajo y de esa manera estandarizar un método electroanalítico para la determinación de iones Zn^{2+} en muestras de líquido seminal.

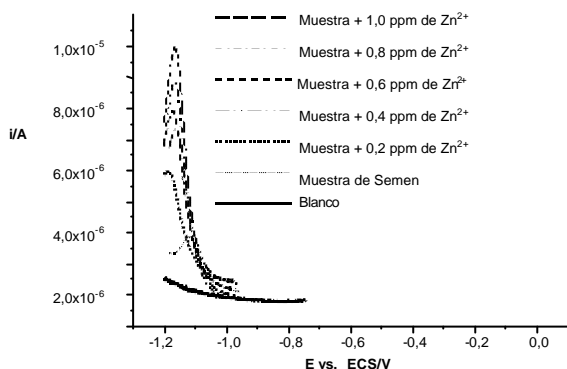


Figura 5. Familia de voltamogramas obtenida por VDA de la oxidación de Zn a Zn^{2+} en una muestra de líquido seminal a la cual se añadieron cantidades determinadas de una solución patrón de Zn^{2+} , utilizando un electrodo de carbón vítreo de construcción propia y modificado electroquímicamente con una película de mercurio.

La figura 6 muestra la familia de voltamogramas obtenidos de la señal de oxidación de Pb a Pb^{2+} en una solución de un suplemento dietético rico en calcio previamente tratado por combustión a $100^{\circ}C$ y calcinación a $750^{\circ}C$, al cual se le adicionó cantidades determinadas de una solución patrón de Pb^{2+} . En esta figura se observa nuevamente que bajo ciertas condiciones experimentales, la respuesta del sensor electroquímico utilizado es bastante buena a los cambios en concentración de iones Pb^{2+} presentes en la solución que esta siendo investigada en la celda electroquímica. Actualmente se están realizando otras investigaciones para optimizar las condiciones de trabajo y de esa manera estandarizar un método electroanalítico para la determinación de iones Pb^{2+} en preparados farmacéuticos y en fluidos biológicos.

CONCLUSIONES

1. El sensor electroquímico construido, caracterizado y modificado electroquímicamente en el laboratorio presentó una alta sensibilidad y especificidad en la detección electroquímica de elementos trazas como Zn^{2+} , Pb^{2+} y el Cu^{2+} .

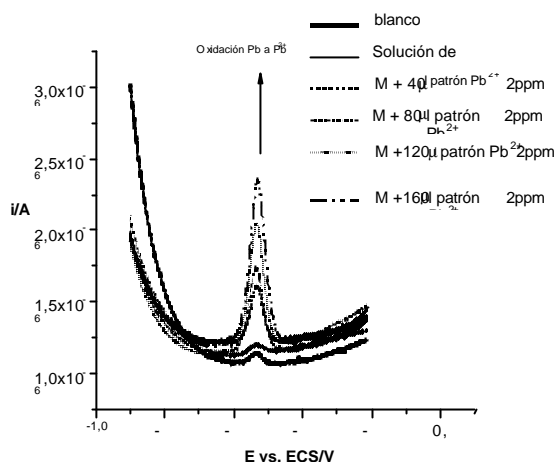


Figura 6. Familia de voltamogramas obtenidos por VRA de la oxidación de Pb a Pb^{2+} en una muestra comercial de un suplemento dietético rico en calcio (Oscal tab) previamente tratada a la cual fue adicionada cantidades determinadas de una solución patrón de Pb^{2+} , utilizando un electrodo de carbón vítreo de construcción propia y modificado electroquímicamente con una película de mercurio.

2. El uso de la técnica de Voltametría de Pulso Diferencial de Redisolución anódica, utilizando el sensor electroquímico construido en el laboratorio mostró ser bastante eficaz en la detección de trazas de Pb^{2+} presente en muestras de orina y suplementos ricos en calcio.

3. La respuesta electroquímica de la oxidación de Zn y Cu en muestras de orina se ve afectada por la formación de un compuesto intermetálico de Cu-Zn en la película de mercurio cuando la concentración de estos iones es alta, lo cual no permite el uso de la misma muestra para determinar simultáneamente la concentración de estos metales.

4. El sensor electroquímico mostró una buena respuesta electroquímica a la detección de Zn^{2+} en muestras de líquido seminal una vez conseguidas las condiciones en las cuales la formación del compuesto intermetálico Zn-Cu es inestable.

5. El uso del sensor electroquímico construido junto con la técnica de Voltametría de Pulso Diferencial de Redisolución anódica permite identificar otros metales trazas presentes en los fluidos biológicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mart, I., Nurnbeg, H.W., and Valenta, P.1980. **Anal. Chem.** Vol. 300: 350.
 2. Nurnberg, H.W., Valenta, P., Mart, L., Raspor, B., and Sipos, L. 1976. **Z. Anal. Chem.** Vol. 282: 357.
 3. Copeland, T.R., Christie, J.H., Osteryoung, R.A., and Skogerboe, R.K.. 1973. **Anal.Chem.** Vol. 45: 2171.

2. Copeland, T.R., Christie, J.H., Osteryoung, R.A., and Skogerboe, R.K.. 1973. **Anal.Chem.** Vol. 45: 2171.
3. Bond, A.M., Fleishmann, M., and Robinson, J.1984. **J. Electroanal. Chem. Vol.** 168: 299.
4. Hakanson, H., Kyrolainen, M., and Mattiason, M. 1993. **Biosens. Bioelectron.** Vol. 8: 213.
5. Willner, I., and Riklin, A. 1994. **Anal. Chem.** Vol. 66: 1535.
6. Silber, A., Brauche, C., and Hampp, N. 1994. **Sens. Actuators.** Vol. 18-19: 235.
7. Csoregi, E., Gorton, L., and Marko-Varga, G. 1993. **Anal. Chem. Acta.** Vol. 273: 59.
8. Shiraishi H., and Takahashi, R. 1994. **Anal. Sci.** Vol. 10: 133.
9. Wang, J. 1987. **Analyst.** Vol 112: 1303.
10. Cai, X., Kalcher, K., Neuhold, C., and Ogorevc, B. 1994. **Talanta.** Vol. 41: 407-413.
11. Roa G. Ramirez, Silva MT, Romero-Romo MA, Galicia L. 2003. **Anal Bioanal. Chem.,** Vol. 377(4): 763
12. Céspedes, F., Fábregas, M.J., Bartroli, J., and Alegrats, S. 1993. **Anal. Chem. Acta.** Vol. 273: 409.
13. Kinoshita, K. 1998. **Carbon-Electrochemical and Physiochemical Properties.** Wiley-Interscience, New York.
14. Tripathi RM, Raghunath R., Mahapatra S., Sadasivan S. Sci. 2001. **Total Environ.** Vol. 273: 161.
15. Herzberg M., Lusky A., Blonder J. 1987. **Frenkely, Obatetrie Gynecologies.** Vol. 87(6): 1035-1040.
16. Xu, B., Chia, S., and Ong, C. 1994. **Bio. Trace Elem- Res.** Vol. 40(1): 49-57.
17. Chia, S., Ong, C., Chua, L., Ho, L., and Tay, S., 2000. **J. Androl.** Vol 21(1): 53-57.