

METODOS AMPEROMETRICO Y POTENCIOMETRICO PARA LA DETERMINACION DE GLUCOSA SANGUINEA. REPORTE PRELIMINAR

M. Borrajero Montejo, C. Pascual Marqu y C. Bauta Martín.

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba

RESUMEN. Se utilizan dos métodos electroquímicos para la medición de glucosa en muestras de sangre total y suero sanguíneo. El método potenciométrico emplea una mezcla de glucosa oxidasa, peroxidasa y ABTS (sulfonato de 2,2-azino-di(3-etil-benzotiazolina-6)). Se encontró una correlación lineal entre la concentración de glucosa y los valores de potencial registrados. Con respecto al método espectrofotométrico convencional el coeficiente de correlación calculado fue de 0,99. El método amperométrico se basó en el empleo de un electrodo enzimático de glucosa oxidasa y se encontró una correlación lineal entre la concentración de glucosa en muestras de suero y la corriente del electrodo a un tiempo fijo de reacción. El coeficiente de correlación hallado fue de 0,96.

ABSTRACT. Two electrochemical methods for glucose determination in total blood and serum samples were used. The potentiometric method employs a mixture of glucose oxidase, peroxidase and ABTS (di-ammonium 2,2 azinobis 3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate). A linear correlation between glucose and potential values was found. In relation with the conventional spectrophotometric method a correlation coefficient of 0.99 was obtained. The amperometric method employs an enzymatic glucose oxidase electrode. Similarly a linear correlation was found between glucose concentration in serum samples and amperometric values registered at a fixed time interval. The correlation coefficient was 0.96.

INTRODUCCION

Los métodos de detección electroquímica aplicados en la búsqueda de metabolitos y diversos tipos de biomoléculas, están siendo cada vez mas usados con fines analíticos.¹⁻⁴ Estos métodos no sufren interferencias por color ni turbidez de la mezcla de reacción y emplean pequeñas cantidades de reactivo y de muestra.

La medición de la concentración de glucosa es esencial en muestras de muy diverso tipo⁵⁻⁸ por lo que continuamente se desarrollan nuevos métodos para su determinación.^{9,10} El empleo de estas técnicas resulta de extraordinaria utilidad, pues una vez normalizadas pueden constituir un ahorro significativo en términos de consumo de reactivos.

En el presente trabajo se describe una técnica potenciométrica para la medición de glucosa sanguínea, empleando una mezcla de glucosa oxidasa, peroxidasa y ABTS, en la que se mide el cambio del potencial redox que transcurre durante la reacción. El método es rápido y económico y presenta alta correlación con respecto al método espectrofotométrico convencional. Se describe asimismo, una técnica amperométrica para la detección de glucosa sérica, empleando un electrodo enzimático de glucosa oxidasa.

La confección de electrodos enzimáticos para su empleo como biosensores constituye una tecnología de gran relieve en la actualidad, con múltiples aplicaciones en el campo de la Bioquímica Clínica.¹¹⁻¹⁵

MATERIALES Y METODOS

Método Potenciométrico

Electrodo de platino (Radiometer Type 1312 PT).

Electrodo de calomel saturado (referencia).

Registrador de pH (Radiometer Type 28, Copenhagen).

Juego diagnóstico para la determinación de glucosa (Boehringer Mannheim, God-Perid Method).

Muestras de sangre heparinizadas de individuos sanos y diabéticos.

El reactivo mezcla del juego diagnóstico comercial, compuesto por solución amortiguadora de fosfato 1 mmol/L pH 7, peroxidasa 0,8 UI/mL y ABTS (sulfonato de diamonio 2,2 azinobis 3-etilbenzotiazolina) fue empleada para las determinaciones de glucosa mediante el método espectrofotométrico, así como por el método potenciométrico.

El principio de medición del método potenciométrico se basa en el cambio de potencial que se produce al transcurrir una reacción redox. El cambio en las cantidades relativas de especies oxidadas y reducidas produce un cambio en el potencial resultante de la mezcla que obedece a la ecuación de Nernst.¹⁶ En este caso, la glucosa se oxida por acción de glucosa oxidasa y el peróxido de hidrógeno que

se obtiene como producto es oxidado a continuación por peroxidasa en presencia de ABTS.

Experimentalmente se ha encontrado que el ABTS constituye la especie de mayor contribución al cambio de potencial, aplicando extraordinariamente la respuesta que se desea detectar.

Las muestras de sangre fueron analizadas en paralelo por ambos métodos. Para el análisis potenciométrico se hizo reaccionar a partes iguales el reactivo mezcla (preparado al doble de concentración) con la muestra de sangre diluida 1/100 en solución salina (volumen total de reacción de 100 L).

Las determinaciones se realizaron con los dos electrodos sumergidos, registrando numéricamente los valores de potencial que se desarrollaban a distintos tiempos. Se realizó una curva de calibración con soluciones patrones de glucosa en solución salina (2,5; 5,0; 7,5; 10 mmol/L diluidas 1/100 en el momento de la reacción).

Método Amperométrico

Glucosa oxidasa (Boehringer Mannheim, 22 000 UI/mg).

Microamperímetro de diseño propio con fuente de voltaje incorporada.

Electrodo de trabajo de platino recubierto con membrana enzimática.

Contraelectrodo de trabajo de platino de área 10 veces mayor que a del electrodo de trabajo.

Muestras de suero sanguíneo de individuos sanos y diabéticos.

Juego diagnóstico para determinación de glucosa (Boehringer Mannheim God-Perid Method).

Glutaraldehído 25 % (BDH).

La determinación de glucosa se realizó mediante el empleo de amperometría a potencial constante de 400 mV (ECS) (potencial de oxidación del peróxido de hidrógeno) empleando una fuente de voltaje y un microamperímetro construidos al efecto. Para ello, se tuvo en cuenta el rango lineal de la relación corriente vs. concentración de glucosa, determinado anteriormente mediante experimentos de voltametría de pulso diferencial.

El electrodo enzimático se preparó depositando 1 a 2 L de mezcla enzimática en forma de capa fina sobre la superficie del electrodo de platino. La mezcla enzimática contenía glucosa oxidasa 4,2 UI/L, glutaraldehído 1,4 % y albúmina sérica bovina 4,2 %. La mezcla se dejó polimerizar 18 h a 4 °C, se lavó el electrodo con solución amortiguadora de fosfato citrato 100 mmol/L pH 7 y se cubre la superficie con membrana de diálisis.

El valor de corriente se determinó a un tiempo de 30 s después de introducir los electrodos en la muestra e imponer el potencial, al cabo de los cuales se observa una respuesta estable.

Las muestras de suero se diluyeron previamente a la determinación 1/5 en solución amortiguadora de fosfato citrato 100 mmol/L pH 7, con el objetivo de ajustar la concentración al rango lineal de medi-

ciones y de suministrar un electrolito soporte adecuado para la determinación del peróxido.

RESULTADOS

Método Potenciométrico

Se obtuvieron curvas de potencial en función del tiempo de reacción de cada una de las soluciones patrón de glucosa y de las muestras de sangre (Figuras 1 y 2). La geometría de éstas curvas es resultante de al menos dos factores que son la cinética enzimática de la reacción y el efecto nernstiano sobre las reacciones redox catalizadas por enzimas.

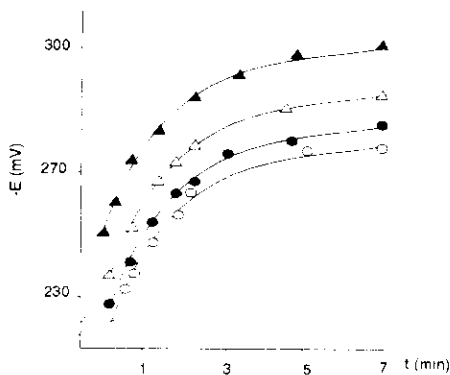


Fig 1. Valores de potencial en función del tiempo durante la reacción de cuatro soluciones patrones de glucosa (2,50 (●), 5,00 (●), 7,50 (▲), 10,0 (▲) mmol/L con el reactivo de ABTS

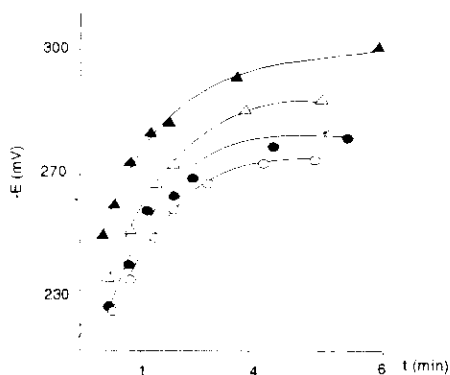


Fig 2. Valores de potencial en función del tiempo durante la reacción de muestras de sangre total de individuos sanos (●) y diabéticos (▲) con el reactivo de ABTS

La dependencia entre el valor del potencial (mV) alcanzado a los 2 min de reacción y la concentración de glucosa de las soluciones patrón correspondió a una línea recta cuyo ajuste sirvió como curva de calibración del método (Figura 3).

Esta correlación permitió calcular la concentración de glucosa en muestras de sangre total, a partir del valor de potencial a los 2 min de reacción (Tabla I). El coeficiente de correlación del método potenciométrico respecto al espectrofotométrico fue de 0,99.

Método amperométrico

Mediante la ecuación de una línea recta se ajustó la dependencia entre el amperaje registrado a los 30 s de reacción y la concentración de glucosa en sueros sanguíneos empleados como patrones. Esta correlación permitió calcular la concentración en los sueros problema, a los cuales se les realizó también la determinación espectrofotométrica con el objetivo de correlacionar ambos métodos. El coeficiente de correlación hallado fue de 0,96.

Tabla I

Correlación entre método potenciométrico y espectrofotométrico para determinación de glucosa en sangre total

Muestra No.	Potenciométrico	Espectrofotométrico	
	E (-mV)	Glucosa (mmol/L) método	
1	268	5,40	5,51
2	266	4,92	4,94
3	265	4,68	4,70
4	264	4,44	4,51
5	266	4,92	5,00
6	292	11,1	11,3
7	276	7,33	7,10

E (-mV): Mediciones potenciométricas realizadas a los 2 min de reacción. La relación entre los valores de E (-mV) y la concentración de glucosa (mmol/L) se ajusta a: $Y = 4,16 X + 245,5$ donde Y es el potencial y X la concentración.

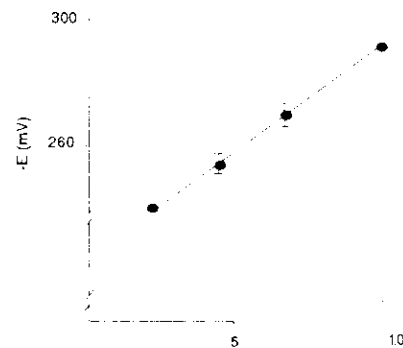


Fig 3. Valores de concentración de glucosa de las soluciones patrones vs. voltaje alcanzado a los 2 min de reacción. Las barras verticales indican las dispersión de las réplicas.

DISCUSION

Aunque el método espectrofotométrico emplea los mismos reactivos que el método convencional, presenta la ventaja de consumir cincuenta veces menor cantidad de éstos y de no requerir de pasos previos de desproteinización ni separación de los elementos de la sangre. Por otra parte, el método amperométrico presenta la ventaja adicional de que emplea como única enzima una pequeña cantidad de glucosa oxidasa, necesaria para la construcción del biosensor de glucosa.

El biosensor de glucosa puede ser reutilizado durante días o semanas sin requerir la preparación de nuevas soluciones o reactivos, lo cual representa asimismo una ventaja económica. La calibración de este método debe realizarse con sueros de concentración conocida empleados como patrones, pues en este caso la velocidad de difusión de la glucosa hacia el electrodo incide en la dinámica de la detección. Quizás este factor sea responsable en alguna medida, de la obtención de un coeficiente de correlación menor con respecto al método espectrofotométrico que el hallado de igual modo con el método potenciométrico.

Ambos métodos son rápidos y emplean equipos de uso común, disponibles en prácticamente cualquier laboratorio, aún los menos especializados. La construcción de biosensores constituye una tecnología de gran actualidad, pues además de las ventajas antes mencionadas, son la base para el desarrollo de equipos de monitoreo cuyo objetivo es prácticamente imposible de lograr mediante las técnicas convencionales; por ello resultaría muy útil la introducción y desarrollo de estas técnicas en Cuba, particularmente en relación con la preparación de electrodos enzimáticos con fines analíticos.

CONCLUSIONES

Los métodos de detección de glucosa estudiados mostraron una alta correlación con respecto al método espectrofotométrico convencional y su concepción obedece a la tendencia a la reducción de los volúmenes tanto de reactivos como de muestra, a la reducción del tiempo que se requiere para el ensayo, así como a la miniaturización en el diseño de los sistemas de detección, que constituyen el punto de partida para el desarrollo de las estrategias de monitoreo, detección in vivo, etcétera.

BIBLIOGRAFIA

1. Tsuji I., Eguchi H., Yasukouchi K., Unoki M., and Tanigushi I. **Biosensors & Bioelectronics** 5, 87, 1990.
2. Schasfoort R.B.M., Kooyman R.P.H., Bergveld P. and Greve J. **Biosensors & Bioelectronics** 5, 103, 1990.
3. VanDyke D.A. and Cheng H.Y. **Analytical Chemistry** 61, 663, 1989.
4. Rishpon J. and Rosen D.I. **Biosensors** 4, 61, 1989.
5. Sternberg R., Barrau M.B., Gangiotti L. and Thévenot D.R. **Biosensors** 4, 27 1988.
6. Moody G.J., Sanghera G.S., and Thomas J.D.R. **Analyst** 112, 65, 1986.
7. Moody G.J., Sanghera G.S., and Thomas J.D.R. **Analyst** 111, 605, 1986.
8. Schoonen A.J.M., Schmidt F.J., Hasper H., Verbrugge D.B.A., Tiessen R.G. and Lerk C.F. **Biosensors & Bioelectronics** 5, 37, 1990.
9. Sternberg R., Bindra D.S., Wilson G.S. and Thévenot D.R. **Analytical Chemistry** 60, 2781, 1988.
10. Al-Hitti I.K., Moody G.J. and Thomas J.D.R. **Analyst** 109, 1205 1984.
11. Rechnitz G.A. **Analytical Chemistry** 60, 1996, 1990.
12. Kobos R.K. **Analytica Chimica Acta** 180, 281, 1986.
13. Campanella L. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 6, 717, 1988.
14. Vadgama P. **Analyst** 111, 875, 1986.
15. Tor R. and Freeman A. **Analytical Chemistry** 58, 1042, 1986.
16. Ewing G.W. **Instrumental Methods of Chemical Analysis**. 2nd. Edition, 165 y 202, 1969, Cuba.



UN VERDADERO APORTE A LA ALTURA DE UN NOBLE OBJETIVO

- ☑ Para la determinación **REALMENTE RAPIDA** del antibiograma y la infección urinaria
- ☑ De **FACIL** manipulación por el microbiólogo Clínico
- ☑ Su **BAJO COSTO** de inversión y mantenimiento posibilita su intrucción en **TODAS** las instalaciones de salud
- ☑ **BASADO EN VERDADERAS** soluciones técnicas **PRIMER LECTOR** conductimétrico a microflujo continuo
- ☑ Garantiza resultados **CONFIABLES** en 4 horas a partir de muestras positivas **NO PURIFICADAS**

Producido y exportado por: CNIC
Centro Nacional de Investigaciones Científicas./ Ave. 25 y calle 58, Cubanacán, Playa, C. de La Habana, Cuba.
Apartados Postales 6880 y 6990 / Teléfono: 21 8066 / Teléx: 51 1582 CNIC CU