UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS Y CONTROL
CATEDRA FISICOQUÍMICA

DESARROLLO DE UN SENSOR ELECTROQUÍMICO BASADO EN NANOPARTÍCULAS DE ORO SOPORTADAS EN RUTINA PARA LA DETECCIÓN DE ÁCIDO ÚRICO EN PRESENCIA DE INTERFERENTES

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Licenciada en Bioanálisis

www.bdigital.ula.ve

Autor:

Kuinderlly Danivze Nieto Duran

Tutor:

Prof. Sabino Menolasina

Cotutor:

Prof. Carlos Travieso

Mérida, Octubre de 2017

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso por permitirme tener la fe, la sabiduría, la salud y la fortaleza para llegar hasta aquí.

A mis padres por ser mí pilar, mi apoyo y mi ejemplo a seguir.

A mis hermanos por apoyarme y alegrar mis días durante este recorrido.

A mis sobrinos que cada día me regalaron sonrisas de alegría.

Este logro es para ustedes.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

AGRADECIMIETOS

A la ilustre Universidad de los Andes, por abrirme sus puertas dándome la oportunidad de cumplir una de mis metas.

Al CDCHT, al Laboratorio de Investigaciones de electroquímica de Análisis Instrumental y al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis por prestar su colaboración para el desarrollo de esta investigación.

Al profesor Sabino Menolasina por su valiosa tutoría, por la orientación y la ayuda que me brindó para la realización de esta tesis, al profesor Carlos Travieso por su excelente trabajo como cotutor, por su apoyo, paciencia, dirección y enseñanza en todo el proceso de investigación y redacción de esta tesis.

www.bdigital.ula.ve

A mi padres y hermanos, porque en mis triunfos y en mis tropiezos, en mis errores y en mis aciertos, siempre los he tenido a mi lado. Siempre velan por mi felicidad. Querida familia, los amo, gracias por su amor incondicional.

A mis amigos, por su cariño sincero, por los grandes momentos vividos durante esta carrera y por siempre prestarme un gran apoyo en los momentos difíciles de este recorrido.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
VEREDICTO	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	x
RESUMEN	xi
Introducción	1
Capítulo I: El problema	
Planteamiento del problema	3
Justificación e importancia de la investigación	4
Objetivos	5
Objetivo general	5
Objetivos específicos	6
Alcances y limitaciones	6
Capítulo II: Marco teórico	
Trabajos previos	8
Antecedentes históricos o epistemológicos	10
Bases teóricas	11
Ácido úrico	11
Características fisicoquímicas del ácido úrico	12
Cristalización y precipitación	12
Atracción	13
Disociación iónica	13
Comportamiento ácido	14

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Descomposición del ácido úrico 14
Excreción 14
Valores normales y patologías 15
Interferencias en la determinación de ácido úrico 16
Sustancias usadas para la modificación de la superficie electródica 17
Rutina 17
Nanopartículas de oro (AuNPs) 18
Sensores 19
Sensor electroquímico 20
Técnicas electroquímicas 20
Técnicas voltamperométricas 20
Voltamperometría cíclica (VC) 21
Voltamperometría de pulso diferencial (VPD) 22
Componentes electroquímicos 23
Celda electroquímica 23
Electrodos 24
Electrodo de trabajo 24
Electrodo de referencia 25
Electrodo auxiliar 25
Evaporación del solvente (drop-casting) 26
Capitulo III: Marco metodológico 27
Tipo de investigación 27
Diseño de la investigación 27
Materiales y métodos 28
Materiales e instrumentos 28
Reactivos 29
Limpieza del material 30
Preparación del sensor electroquímico 30
Solución de rutina 31

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Nanopartículas de oro 31
Electrodeposición de la rutina en el carbón vítreo (CV) 31
Adsorción de AuNPs por evaporación del solvente (Drop-Casting) 32
Procedimiento para determinar electroquímicamente AU 32
Capítulo IV: Resultados y discusión 33
Caracterización de las AuNPs 33
Caracterización del electrodo de carbón vítreo 36
Determinación del factor de rugosidad y del área real 36
Preparación del sensor electroquímico 38
Electrodeposición de la rutina 38
Adsorción de AuNPs por evaporación del solvente (Drop-Casting) 42
Comportamiento del CV modificado en las diferentes etapas del desarrollo del sensor electroquímico AuNPs/Ru/CV 42
Comportamiento electroquímico del sensor AuNPs/Ru/CV en presencia de AU y AA 45
Comportamiento electroquímico del sensor AuNPs/Ru/CV a diferentes concentraciones de AU 47
Cálculos estadísticos para evaluar el comportamiento analítico del sensor electroquímico AuNPs/Ru/CV en la detección de AU 49
Límite de detección y cuantificación
Conclusiones 53
Referencias bibliohemerográficas 54

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

INDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1: Estructura química del ácido úrico 11

Figura 2: Estructura de los isómeros del ácido ascórbico 17

Figura 3: Estructura de la rutina 18

Figura 4: Colores de la suspensión coloidal de nanopartículas de oro según su tamaño 19

Figura 5: a) cambio del potencial en función del tiempo y b) curva corriente/potencial resultante en un experimento de voltametría cíclica 22

Figura 6: A) Señal de excitación en pulsos de potencial en función del tiempo y B) Respuesta electroquímica a la señal de excitación 23

Figura 7: Evaporación del solvente (drop-casting) 26

Figura 8: Figura 8: a) Electrodo de trabajo de carbón vítreo, b) Contraelectrodo de alambre de platino, c) electrodo de referencia Ag/AgCl saturado 28

Figura 9: Sistema electroquímico 29

Figura 10: Formación de nanopartículas de oro 33

Figura 11: Espectro de absorción UV-Vis de la suspensión coloidal de nanopartículas de oro. 35

Figura 12: Respuesta electroquímica del electrodo de CV en $HClO_4$ 0,1 M 36

Figura 13: Comportamiento del CV en KNO_3 0,1 M con $[Fe(CN)6]^{-4}$ $[Fe(CN)6]^{-3}$ $5x10^{-3}$ M a 50 mV/s. 38

Figura 14: Respuesta electroquímica del CV activado con $NaHCO_3$ 0,1 M 39

Figura 15: Forma oxidada de la rutina 40

Figura 16: Mecanismo de inmovilización de la rutina sobre CV 41

Figura 17: (A) Respuesta electroquímica del CV en H_3PO_4 0,1 M con

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

rutina 1x10^{-3} M y (B) Respuesta electroquímica del Ru/CV en Bufer fosfato salino (BFS) 0,1 M + KCl 0,1 M pH 6,0 41
Figura 18: AuNPs/Ru/CV en una solución BFS 0,1 M + KCl 0,1 M pH 6,0 42
Figura 19: Comportamiento del CV en BFS 0,1 M + KCl 0,1 M pH 6,0 en sus diferentes etapas de modificación. 43
Figura 20: Comportamiento del CV en las diferentes etapas de modificación en una solución de KNO_3 0,1 M con $[Fe(CN)6]^{-4}$ $[Fe(CN)6]^{-3}$ 5x10^{-3} M. 44
Figura 21: Comportamiento electroquímico del AuNPs/Ru/CV en KNO_3 0,1 M con $[Fe(CN)6]^{-4}$ $[Fe(CN)6]^{-3}$ 5x10^{-3} M a diferentes velocidades de barrido. 45
Figura 22: Voltamperograma cíclico de la respuesta electroquímica del AuNPs/Ru/CV en presencia de AU y AA. 46
Figura 23: Voltamperograma de pulso diferencial de la respuesta electroquímica del AuNPs/Ru/CV en presencia de AU y AA. 47
Figura 24: Voltamperograma de pulso diferencial de la respuesta electroquímica del AuNPs/Ru/CV en presencia de diferentes concentraciones de AU 48
Figura 25: Curva de calibración corriente (A) vs. Concentración de AU (mM) 49

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

INDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1: Parámetros electroquímicos utilizados en VC y VPD para estudiar el comportamiento electroquímico del AuNPs/Ru/CV en presencia de AU y AA. 45

Tabla 2: Parámetros electroquímicos utilizados en VPD para estudiar el comportamiento electroquímico del AuNPs/Ru/CV en presencia de diferentes concentraciones de AU 47

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LICENCIATURA EN BIOANÁLISIS
LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
Sensores electroquímicos

DESARROLLO DE UN SENSOR ELECTROQUÍMICO BASADO EN NANOPARTÍCULAS DE ORO SOPORTADAS EN RUTINA PARA LA DETECCIÓN DE ÁCIDO ÚRICO EN PRESENCIA DE INTERFERENTES

Trabajo de Grado

Autor: Kuinderlly D. Nieto D.
Tutor: Prof. Sabino Menolasina
Cotutor: Prof. Carlos Travieso

RESUMEN

La hiperuricemia y la hiperuricosuria, son alteraciones metabólicas muy comunes en la población causando en algunos pacientes el desarrollo de ciertas patologías, como gota y litiasis renal. Las técnicas espectrofotométricas y enzimáticas usadas actualmente, para determinar la concentración de ácido úrico (AU), son sensibles a sustancias interferentes que pueden alterar los resultados de un análisis. El objetivo de esta investigación fue diseñar un sensor electroquímico para la detección y/o cuantificación de AU en soluciones acuosas en presencia de interferentes, como el ácido ascórbico (AA). Para esto se modificó la superficie de un electrodo de carbón vítreo con rutina y nanopartículas de oro y se obtuvo que bajo las condiciones experimentales optimas, la oxidación electrocatalítica del AU se dió a 0,367 V aplicando la técnica de voltamperometría cíclica y a 0,319 V utilizando voltamperometría de pulso diferencial. La curva de calibración se obtuvo con una linealidad aceptable en un rango de concentraciones de 0,41 mM a 0,90 mM (r^2= 0,9996), presentando un límite de detección de 0,092 mM y un límite de cuantificación de 0,32 mM con el uso de voltamperometría de pulso diferencial. El sensor electroquímico desarrollado presentó una excelente respuesta en la detección del AU ya que separó la señal analítica del AU de la sustancia interferente.

www.bdigital.ula.ve

Palabras claves: Ácido úrico, sensor electroquímico, rutina, nanopartículas, electrodo, carbón vítreo, voltamperometría.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

INTRODUCCION

Actualmente, la hiperuricemia y la hiperuricosuria, son alteraciones metabólicas muy comunes en la población y algunos pacientes pueden desarrollar ciertas patologías (Rozo y Gutiérrez, 2003). Es por esto que es necesario cuantificar los valores de ácido úrico (AU) por un método simple y rápido en los laboratorios clínicos (Zhu et al, 1999). Los métodos electroquímicos son ideales porque son más selectivos, consumen menos tiempo y pueden ser aplicados a determinaciones en tiempo real in vivo (Guangzhi et al, 2008).

El AU (2,6,8-trihidroxipurina) y otras oxipurinas son el principal producto final del metabolismo de purinas en el cuerpo humano (Liang et al, 2006). Extremas anormalidades en los niveles de AU son sintomáticos de varias enfermedades, incluyendo gota, hiperuricemia y la enfermedad de Lesch-Nyan (Wang et al, 2006). Diversos estudios epidemiológicos han sugerido que la producción excesiva de AU en suero humano es también un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares (Syed et al, 2012).

www.bdigital.ula.ve

Con frecuencia, las técnicas espectrofotométricas y enzimáticas son usadas para determinar la concentración de AU (Guangzhi et al, 2008); pero estas técnicas en general requieren reactivos lábiles, costosos y dependen mucho de la temperatura (Guialab, 2011). Asimismo, estas son sensibles a sustancias interferentes que pueden alterar los resultados del análisis; Por esto en los últimos años se han venido desarrollado sensores electroquímicos para determinar distintas sustancias de interés clínico (Guialab, 2011). La mayoría de los laboratorios de análisis clínico dependen de kits de sustancias que son suministradas por corporaciones farmacéuticas internacionales para la valoración y cuantificación de una variedad de

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

sustancias químicas y patógenas que pueden estar presentes en fluidos biológicos (Menolasina, 2004).

Un sensor electroquímico es sobre todo un conductor eléctrico que se incorpora en el seno de un medio a estudiar y donde se establece una transferencia de carga entre las sustancias presentes en la solución y el sensor a través de la interfase electrodo – solución (CSIC y CDTI, 1987). Una de las desventajas de estos sensores es que reaccionan en presencia de interferentes que presentan potenciales de oxidación cercanos al potencial de oxidación de la sustancia a estudiar (Guangzhi et al, 2008).

En el presente proyecto de investigación se desea diseñar un sensor electroquímico para la determinación de AU, modificando la superficie electródica con sustancias orgánicas como rutina, que permitan inmovilizar nanopartículas de oro (AuNPs) y así separar la señal electroquímica de interés de la señal de las sustancias interferentes como el ácido ascórbico (AA), también presentes en sangre y orina, a través del uso de técnicas electroquímicas como voltamperometría cíclica (VC) y voltamperometría de pulso diferencial (VPD).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Capítulo I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

Durante muchos años el AU no era considerado como una sustancia problema en el mundo de la medicina; pero en 1776, dos años después del descubrimiento del oxígeno, Karl Wilhelm Scheele descubrió AU en una calcificación, y en el mismo año, el Profesor T. Olof Bergman halló la sustancia en unos cálculos cistíticos (Abner, 1907). Ambos investigadores publican sus hallazgos y otros investigadores descubren varios de los productos de descomposición del AU como la urea, su forma de sal insoluble en concreciones de una enfermedad llamada gota, entre otras (Abner, 1907).

www.bdigital.ula.ve

De esta manera se fueron estudiando todas las características y propiedades del AU; y se pudo observar que el AU era el causante de diversas enfermedades como la gota, la litiasis renal y otras enfermedades que aún en la actualidad están en discusión; por que no se sabe si realmente el AU está implicado en algunas de ellas, como son: la insuficiencia renal, la diabetes mellitus, el síndrome metabólico, la enfermedad hepática crónica, la hipertensión arterial, enfermedad aterosclerótica, entre otras (Álvarez y Mantilla, 2013). El AU se vuelve una sustancia de gran importancia en el mundo de la medicina y se comienzan a desarrollar técnicas y métodos que detecten el AU en muestras fisiológicas como sangre y orina. Cabe destacar, que muchos de los métodos creados presentaban interferencias por otras sustancias presentes también en las muestras fisiológicas, arrojando de esta manera resultados erróneos.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

En Venezuela el método más utilizado es el espectrofotométrico enzimático, el cual presenta interferencias; además requiere de varios reactivos y no es muy sensible.

Es por esto que actualmente se necesitan dispositivos que detecten el AU rápidamente, sean sensibles, prácticos, confiables y que puedan ser miniaturizables; como los sensores electroquímicos, los cuales presentan las características anteriormente descritas y además de esto, con ellos se buscar evitar el inconveniente de las interferencias, y hacer más fácil, rápido y accesible el ensayo.

En esta investigación se utilizarán técnicas electroquímicas, y se desarrollara un sensor electroquímico para la detección de AU en presencia de interferencias. Una vez descrito el problema de estudio y partiendo de las ideas expuestas anteriormente:

¿Se podrá desarrollar un sensor electroquímico que permita detectar y cuantificar ácido úrico en presencia de interferentes, por medio del uso de técnicas electroquímicas y de un electrodo de carbón vítreo modificado química y electroquímicamente con sustancias como rutina y nanopartículas de oro, sintetizadas en el Laboratorio de Investigaciones Electroquímicas (LIE) de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, permitiendo en un futuro cercano aplicarlo en el análisis clínico rutinario?

www.bdigital.ula.ve

Justificación e importancia de la investigación

El AU es una sustancia fabricada por el organismo cuando descompone sustancias llamadas purinas, específicamente adenina y guanina que son las que están implicadas en el metabolismo del AU.

El AU se puede obtener de manera endógena, que es producido por el mismo organismo, y la exógena, que es producido por la dieta por el consumo de alcohol, anchoas, salmón, carnes, sardina, vísceras, cerdo, pollo, entre otros. Cuando estos alimentos se consumen en exceso la

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

concentración del AU en el organismo puede alcanzar niveles por encima de sus valores normales, llegando a causar alteraciones como la gota, litiasis renal, enfermedades cardiovasculares, y otras enfermedades renales. No solo los alimentos nombrados anteriormente pueden elevar los niveles de AU sino que también existen errores congénitos del metabolismo que ocasionan su elevación.

Realizada la revisión bibliográfica, se pudo observar la importancia de la detección y/o cuantificación del AU en muestras clínicas; pero también se evidenció la deficiencia que existe actualmente en los kits y equipos usados para su análisis, es por esto que es necesario la creación de instrumentos de fácil manejo, que no requieran de largos periodos de procesamiento, sensibles, específicos, pequeños, portátiles y lo más importante, que todas estas características le proporcionen confiabilidad a los análisis realizados diariamente en laboratorios clínicos del país.

Los sensores electroquímicos muestran esas propiedades que tanto buscamos en una herramienta; el desarrollo de este dispositivo electroquímico permitirá que se detecte y se cuantifique el AU en diversas muestras médicas evitando la presencia de interferentes y de esta manera se podría establecer una metodología practica para los laboratorios clínicos de Venezuela.

www.bdigital.ula.ve

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Diseñar un sensor electroquímico basado en AuNPs soportadas en rutina, para la detección y/o cuantificación de AU en soluciones acuosas en presencia de interferentes.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Objetivos específicos

- Determinar electroquímicamente el área real y rugosidad del electrodo de carbón vítreo que será modificado para el desarrollo del sensor electroquímico de AU.

- Caracterizar electroquímicamente al electrodo de carbón vítreo modificado con rutina y AUNPs, para el desarrollo del sensor electroquímico.

- Estudiar el comportamiento electroquímico del sensor desarrollado para la detección y cuantificación de AU en presencia de interferentes en soluciones acuosas.

Alcances y limitaciones de la investigación

www.bdigital.ula.ve

Alcances de la investigación

Con esta investigación se quiere lograr el desarrollo de un sensor electroquímico que permita detectar y cuantificar el AU en presencia de sustancias interferentes, comprobando si este puede llegar a ser un instrumento de uso rutinario en los análisis clínicos, mejorando la sensibilidad, especificidad, rapidez y confiabilidad en la determinación de este metabolito. Y buscando a largo plazo que este tipo de dispositivos puedan ser usados para cualquier otro tipo de metabolito del organismo humano que sea de importancia clínica.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Limitaciones de la investigación

Debido a que este proyecto se basa en el desarrollo de un dispositivo, se utilizarán soluciones acuosas, preparadas en el mismo laboratorio donde se llevarán a cabo los diversos experimentos que modificarán la superficie electródica del sensor electroquímico y hasta tanto no se alcance el objetivo planteado, no se podrá utilizar en el análisis de muestras clínicas.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Capítulo II

MARCO TEÓRICO

Trabajos previos

La concentración típica de AU en la orina está en el rango milimolar, mientras que en la sangre está en el rango micromolar. La detección electroquímica de AU es uno de los métodos más viables, pero el mayor obstáculo en el monitoreo de AU son las interferencias de otros componentes electroactivos, como el ácido ascórbico (AA), el cual puede ser oxidado a un potencial cercano al del AU en varios tipos de electrodos (Jian-Bo et al, 2007).

www.bdigital.ula.ve

Los humanos poseen niveles más altos de ácido úrico que la mayoría de los otros mamíferos, pues estos últimos poseen una enzima llamada uricasa o urato oxidasa que metaboliza al ácido úrico circulante, produciendo alantoína que finalmente se elimina por la orina. El gen que codifica para la uricasa es inactivo en humanos y primates (Alcaíno, et al, 2011). Tomando esto en cuenta, se puede decir que el AU tiene una gran importancia médica ya que puede ser utilizado como un marcador en las diversas enfermedades que afectan diariamente a la población mundial.

Debido a lo mencionado anteriormente, se han desarrollado muchas investigaciones con diversas estrategias para modificar un electrodo, de manera tal, que sea específico para la detección del AU.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Autores	Sustancias modificadoras del electrodo de CV	Analito a determinar	Técnica	Muestra	Resultados
Meenakshi y Pandian; 2016	Haloisita y con ácido carboxílico de ferroceno.	Dopamina y ácido úrico	Voltamperometría de pulso diferencial	Solución acuosa preparada en el laboratorio en BFS 0,1 M pH = 7,0.	**El AU se obtuvo en un rango lineal de $1{,}3\times10^{-3}$—1 mM, r^2 = 0.9925 y un límite de detección de 3×10^{-3} mM**
Zhang et al; 2014	Dodecilsulfato sódico (SDS) y nanotubos de carbono de pared múltiple.	Dopamina, ácido úrico y ácido ascórbico	Voltamperometría cíclica y pulso diferencial	Sangre. Suero diluido 20 veces en BFS 0,1 M pH = 5,0.	**El AU se obtuvo en un rango lineal de $4{,}0\times10^{-3}$—0,03 mM con un límite de detección de 4×10^{-5} mM**
Deng et al; 2015	Puntos cuánticos (QD) de CdTe.	Ácido úrico	Voltamperometría cíclica y pulso diferencial	Orina diluida 200 veces en BFS 0,1 M.	**El AU se obtuvo en un rango lineal de 1,0x10-3 – 0,4 mM con un límite de detección de 1x10-4 mM**
Khasanah et al; 2013	Zeolita de impresión	Ácido úrico	Voltamperometría de redisolución anódica	Suero.	**El AU se obtuvo en un rango lineal de 5,6×10-6—2,8x10-5 mM con límite de detección de 5,9x10-6 mM**

www.pdigital.ula.ve

Antecedentes Históricos o Epistemológicos

Guangzhi Hu et al; 2008: Desarrollaron un electrodo modificado con nanopartículas de oro (GNP/LC/GCE) las cuales fueron autoensambladas a la superficie de un electrodo de carbón vítreo modificado con L-cisteína. El electrodo modificado mostró una excelente respuesta en la oxidación electrocatalítica del AU y del AA con 0,306 V de separación en ambos picos, mientras que el electrodo de carbón vítreo desnudo solo dio un pico de oxidación amplio y sobrepuesto. Las corrientes anódicas de AU y AA en el electrodo modificado fueron de 6 y 2,5 veces a la del GCE desnudo, respectivamente. Usando VPD una determinación simultánea y altamente selectiva de AU y AA ha sido estudiada en el electrodo modificado. Con VPD las corrientes de pico del AU y del AA aumentaron linealmente con su concentración en un rango de $6{,}0\times10^{-7}$ a $8{,}5\times10^{-4}$ M y $8{,}0\times10^{-6}$ a $5{,}5\times10^{-3}$ M, respectivamente. El método propuesto fue aplicado para la detección de AU y AA en orina humana con resultados satisfactorios.

www.bdigital.ula.ve

Zhu yan et al; 1999: Estudiaron el comportamiento electroquímico del AU en un electrodo de carbón vítreo modificado usando VC y VPD. Los resultados indicaron que el electrodo modificado presentó una oxidación electrocatalítica eficiente para el AU. El sobrepotencial anódico fue reducido cerca de 200 mV comparado con el resultado obtenido en el electrodo desnudo. El coeficiente de difusión del AU en la solución y la velocidad constante para la reacción catalítica fueron calculados por el diagrama de Koutecky-Levich. Una buena respuesta lineal se obtuvo para el AU en el rango de $7{,}0\text{x}10^{-7}$ a $3{,}0\text{x}10^{-4}$ M. El límite de detección fue de $3{,}7\text{x}10^{-7}$ M. La alta estabilidad y buena selectividad hizo posible el uso en mediciones in vivo.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Bases teóricas

ÁCIDO ÚRICO

El AU ($C_5H_4N_4O_3$) conocido como tri-oxipurina (Abner, 1907) es el producto final del catabolismo de las purinas en humanos producido mediante la acción enzimática de la xantino oxidasa. La principal acción enzimática de la xantino oxidasa es la conversión catalítica consecutiva de hipoxantina a xantina y luego desde xantina a ácido úrico (Alcaíno et al, 2011).

Estructuralmente el AU puede ser considerado como un derivado de las purinas. La palabra purina es aplicada a varias sustancias nitrogenadas, las cuales son derivadas de células animales y vegetales y contienen la molécula química hipotética de $C_5H_4N_4$ una sustancia descubierta por Emil Fischer, quien la hizo sintética y la llamo “Purina”; ya que por el remplazo de sus varios átomos de hidrógeno por los radicales hidroxilo (OH), amino (NH_2), alquilo (CH_3), entre otros, se obtienen un largo número de derivados importantes como las bases nucleicas, ácido úrico, cafeína, teobromina, teofilina, entre otros (Abner, 1907).

www.bdigital.ula.ve

Se verá a partir de la formula racional (dada a continuación en **Figura 1**) del AU, que este está compuesto por la base de purinas con un hidrógeno por cada átomo de nitrógeno (formando purina), y tres átomos de oxígeno unidos a tres átomos de carbono, uno en el segundo átomo, otro en el sexto átomo y otro en el octavo átomo, sugiriendo así el nombre químico 2,6,8-trioxipurina con la fórmula:

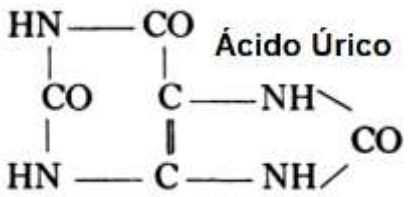


Figura 1: Estructura química del ácido úrico (Abner, 1907).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DEL ÁCIDO ÚRICO

El AU (o lítico) está compuesto por los cuatro elementos principales de la naturaleza: el carbono, el hidrógeno, el nitrógeno y el oxígeno, cuyos átomos se combinan en la siguiente relación para formar la molécula $C_5H_4N_4O_3$. Por lo tanto, el AU se compone del 31,8% de nitrógeno, en peso (Abner, 1907).

El AU puro no tiene sabor y es inodoro. Es un polvo brillante, cristalino, blanco nieve; el cual bajo del microscopio, parece por un momento transparente, cristales sin color, en forma de placas rómbicas, con ángulos redondeados y a menudo unidas en bonitas rosetas. Pueden verse a simple vista en la orina, como arena, grava, polvo de ladrillo y granos de pimienta roja (Abner, 1907).

El AU tiene un pKa de 5,75 y de 10,3 (Gomella, 2007); comportándose como un ácido insípido débil, en cuanto a su solubilidad es menos soluble que la mayoría de sus sales. Es prácticamente insoluble en ácidos diluidos, alcohol, agua de éter o soluciones fuertes de carbonatos alcalinos y es soluble en soluciones débiles alcalinas, por lo tanto, la orina alcalina y la sangre mantienen el AU en solución (Abner, 1907).

www.bdigital.ula.ve

En una solución que contiene tanto AU como fosfatos de sodio (como en la orina y la sangre), el AU es precipitado por los fosfatos ácidos y se mantiene en solución por los fosfatos básicos o neutros. El AU no se produce, como tal, en la orina, sino más bien en sus formas más solubles de sales o uratos, principalmente con los metales alcalinos, sodio y potasio (Abner, 1907).

Cristalización y Precipitación: Una de las características físicas más significativas del AU es su fuerte tendencia a cristalizarse, cuando en solución está en contacto con cualquier sustancia sólida. Esta característica se ha observado con mucha frecuencia, en lo que respecta a la orina; pero

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

es un fenómeno tan común que su importancia ha sido generalmente ignorada o desatendida (Abner, 1907).

Garrod descubrió esta misma tendencia por parte del AU en solución o suspensión en la sangre; lo que llevo a pensar, que la precipitación de los uratos cristalinos en las articulaciones del dedo del pie (GOTA), se debe probablemente en cierta medida a este mismo factor. El mismo principio también es aplicable a otras estructuras de tejidos sólidos, donde los uratos muestran una predilección por depositarse (Abner, 1907).

Atracción: Otra peculiaridad, observada en el estudio de la fisicoquímica del AU, es la tendencia de sus cristales a atraer otros cristales de urato. Hasta donde se conoce, Haig fue el primero en dirigir la atención a este fenómeno y darle aplicación práctica, aunque suponemos que los cristales de la mayoría de las otras sales actúan de manera similar hacia sus cristales hermanos (Abner, 1907).

www.bdigital.ula.ve

Disociación iónica: Se ha demostrado que cuando se está formando una solución acuosa de AU, los dos átomos de hidrógeno disponibles de la molécula de AU están disociados de una manera análoga como la que se produce cuando se forman sus sales con los metales alcalinos. Se forman uno o dos iones hidrógeno (especialmente el anterior), así como los aniones moleculares univalentes o bivalentes resultantes. Cuanto más diluida sea la disolución, mayor será el grado de esta disociación. El número de iones hidrógeno, por supuesto, se incrementa por la adición de un ácido, (como ácido hialurónico), lo que significa también un mayor número de moléculas no disociadas y su precipitación consiguiente. Por lo tanto, para ayudar a la solubilidad del AU, no sólo se trata de aumentar la alcalinidad de la solución, sino de aumentar el número de iones hidrógeno (Abner, 1907).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Su Comportamiento ácido: Se ha encontrado que es una de las principales características químicas de esta sustancia que actúa como un ácido débil, siendo capaz de combinarse fácilmente con los monometales alcalinos para formar sales. En resumen, es un ácido dibásico con la fórmula H_2 ($C_5H_2N_4O_3$). Se verá que tiene dos átomos de H, que pueden ser intercambiados por dos elementos monometálicos. Estos dos átomos de hidrógeno disponibles de AU puro suelen ser reemplazados por uno u otro de los metales alcalinos, sodio o potasio, o puede ser por amonio. Con el litio, se forma su sal más soluble (urato de dilitio) (Abner, 1907).

DESCOMPOSICIÓN DEL ÁCIDO ÚRICO:

Hasta ahora, se ha demostrado que las purinas nitrogenadas, excretadas en la orina como AU, se oxidan bien sea de manera directa de las bases libres de xantina o indirectamente de los nucleótidos o las nucleoproteínas. Pero no todo el AU así derivado y formado en el cuerpo se convierte en excreta de la orina, una parte de él se descompone antes de la excreción y aparece en la orina en la forma de urea principalmente y en un ligero grado en la forma de uno o más derivados de la urea (Abner, 1907).

www.bdigital.ula.ve

El hígado y la mucosa intestinal producen la mayoría del AU. El riñón elimina 2/3 del AU y el tracto gastrointestinal excreta el tercio restante. Las formas ionizadas del AU, los uratos, están presentes en el líquido sinovial y en el plasma; aproximadamente el 98% existe como urato monosódico, con un pH de 7,4 (Gomella, 2007).

Excreción: La orina normal (excreción en 24 horas) contiene de 0,2 a 0,8 gramos de AU. Una cantidad mucho mayor de AU aparece en la orina si no es transformada a urea en el hígado, esto se demuestra por el hecho de que se produce una eliminación mucho mayor de ella cuando se evita que la sangre de la vena porta fluya por el hígado, estableciendo una fistula llamada

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Eck, entre esta y la vena cava inferior y al mismo tiempo es ligada la arteria hepática. De esta manera, la sangre del bazo y de las regiones linfáticas del tracto intestinal son llevadas directamente a la circulación general y la combinación de las bases de xantinas y el AU hallan su camino hacia la orina sin ser sometidas a la acción de las oxidasas del hígado. Por lo tanto podemos concluir que la aparición de estos cuerpos en la orina están bajo condiciones normales, debido al hecho de que no toda la sangre del cuerpo llega al hígado antes de ser llevada a los riñones. Los últimos órganos nombrados actúan simplemente como filtros fisiológicos o dializadores por los cuales pasan los uratos que son traídos desde allí para su excreción final (Abner, 1907).

Los uratos siempre son mantenidos en solución fresca, orina normal, pero después de enfriarse o después de reposar unas cuantas horas, ellos pueden depositarse debido a la reacción que ocurre entre los uratos monosódicos y los fosfatos monosódicos de la orina, resultando en la formación de fosfato disódico y AU libre. La solubilidad del AU y de los uratos en la orina dependen de sus relaciones con los fosfatos neutros o disódicos presentes. Estos últimos poseen el poder de impedir la descomposición de los uratos en AU libre, mientras que la tendencia del fosfato monosódico es causar su descomposición (Abner, 1907).

www.bdigital.ula.ve

VALORES NORMALES Y PATOLOGÍAS

La concentración normal de AU en orina de 24 horas es de 250 a 800 mg este valor puede variar dependiendo de la población y de la dieta de una persona (Williamson et al, 2011). En algunas circunstancias esta concentración puede aumentar excesivamente, esta elevación del AU en sangre y en orina, es conocida como hiperuricemia e hiperuricosuria respectivamente, no causan síntomas agudos. Pero el hecho de no causar

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

síntomas no significa que estos niveles no puedan generar complicaciones. Las dos más comunes son la crisis de gota y las piedras de AU en los riñones; También existe una fuerte certeza de la relación que tienen las altas concentraciones de AU con importantes desordenes, entre los que se encuentran: la insuficiencia renal, la diabetes mellitus (DM), el síndrome metabólico, la enfermedad hepática crónica, la hipertensión arterial, enfermedad aterosclerótica en diferentes ramas del árbol arterial, no obstante, la relación causal entre el ácido úrico y estas enfermedades no ha sido claramente establecida (Álvarez y Mantilla, 2013).

INTERFERENCIAS EN LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ÚRICO

En la detección de AU uno de los métodos más viables es el electroquímico, pero el mayor obstáculo en el monitoreo de AU son las interferencias de otras sustancias electroactivas, como el AA, el cual puede ser oxidado a potenciales muy cercanos al del AU en varios tipos de electrodos (Jian-Bo et al, 2007). El AA es una vitamina hidrosoluble, emparentada químicamente con la glucosa, que solamente es una vitamina para el hombre, los primates superiores, el cobayo, algunos murciélagos frugívoros y algunas aves (Calvo et al, 1991).

www.bdigital.ula.ve

El AA ($C_6H_8O_6$) tiene un peso molecular de 176,13 gr/mol y posee propiedades ácidas y fuertemente reductoras. Tales propiedades se deben a su estructura enediol y a la posibilidad de ionizar el hidroxilo situado sobre el carbono 3, formando un anión que queda estabilizado por resonancia. Eventualmente, puede disociarse el hidroxilo del carbono 2, formando un dianión, aunque no adquiere la misma estabilidad que la del carbono 3. La forma natural de la vitamina es el isómero L que posee propiedades nutricionales; el isómero óptico del carbono 4 D- tiene alrededor de 10% de la actividad del isómero L- pero sin fines vitamínicos **(Figura 2)** al igual que el isómero óptico del carbono 5, el ácido iso-ascórbico (Gregory, 2000).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

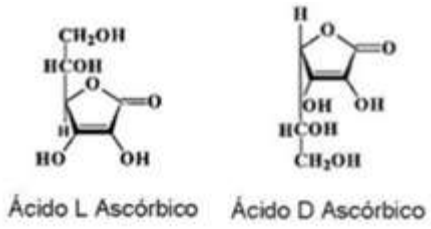


Figura 2: Estructura de los isómeros del AA (Gregory, 2000).

SUSTANCIAS USADAS PARA LA MODIFICICACIÓN DE LA SUPERFICIE ELECTRODICA

RUTINA

Los flavonoides, un grupo largo de polifenoles de origen natural, están fuertemente distribuidos en las plantas, frutas y vegetales y son constituyentes importantes en la dieta humana (Teixeira et al, 2005). Uno de estos flavonoides es la rutina (RU), que es un glucósido entre el flavonolquercetina y el disacárido rutinosa; es también llamada rutósido y es 3',4',5,7-tetrahidroxiflavona-3b-d-rutinósido y su estructura química correspondiente está dada en la **(Figura 3)** (Reynolds, 1996). La rutina se forma creando un enlace entre el disacárido y el grupo hidroxilo de la quercetina. Puede combinarse con cationes, proveyendo nutrientes a las células de las plantas. En humanos, liga el ion Fe^{2+}, previniendo su enlace al peróxido de hidrógeno, que de otra manera formaría un reactivo de radical libre que podría dañar las células (Fundación Wikimedia, Inc. 2014).

Algunas investigaciones muestran que la RU tiene un amplio rango de actividades fisiológicas como antiinflamatorias, antitumorales y antibacterianas. Además, tiene varias actividades farmacológicas incluyendo antialérgica, vasoactiva, antiviral y propiedades antiprotozoarias (Mauludin y Müller, 2009).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

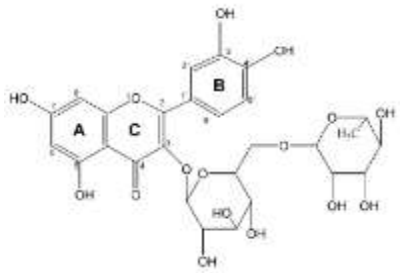


Figura 3: Estructura de la Rutina (Reynolds, 1996).

NANOPARTICULAS DE ORO (AuNPs)

Las nanopartículas son entidades, generalmente de forma esférica, con dimensiones entre 1 a 100 nm. La obtención de nanopartículas metálicas estables en solución ha sido un área muy activa de investigación. Las más comúnmente sintetizadas y estudiadas son las de metales nobles: oro, plata y paladio fundamentalmente (Díaz, 2012).

Específicamente, las nanopartículas de oro (AuNPs), exhiben excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, intrínsecas a su tamaño nanométrico. Además, las AuNPs pueden ser producidas en distintos tamaños y formas y pueden ser fácilmente funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos (anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético, etc.). Todo esto hace que las AuNPs despierten un gran interés en multitud de campos, pero especialmente en los sectores biomédicos y alimentarios (Mateo et al, 2013).

www.bdigital.ula.ve

Características como la alta relación de superficie-volumen, alta energía superficial, capacidad para disminuir la distancia entre las proteínas y las partículas de metal, y el funcionamiento como conductor electrónico entre grupos funcionales y la superficie del electrodo, son razones que justifican la modificación de los electrodos con AuNPs para facilitar la transferencia de los electrones entre los analitos redox y superficies de los electrodos (Guo, 2007). En electroquímica se usa una suspensión coloidal de AuNPs en un fluido, generalmente agua. El líquido generalmente es rojo intenso para

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

partículas menores de 100nm o azul para partículas más grandes (Wessling, 1999).

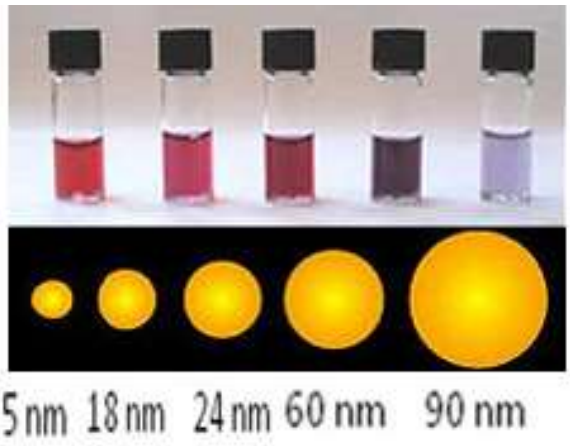


Figura 4: Colores de la suspensión coloidal de AuNPs según su tamaño (Kondinski, 2010).

SENSORES

www.bdigital.ula.ve

Los sensores son dispositivos que transforman la información física o química en una señal útil que pueda ser procesada y, por tanto, que facilite información de interés de una manera rápida y sin necesidad de análisis muy complejos. Existen dos clases de sensores, clasificados según el tipo de información que sean capaces de transformar; están los físicos: dispositivos que detectan cambios en parámetros físicos (temperatura, presión, flujo de masa, etc.) y los químicos: Detectan cambios de pH, concentración, composición, etc. (Pei et al, 2016).

El sensor químico como resultado de la interacción química o de algunos procesos entre el analito y el dispositivo sensor, transforma información química o bioquímica de un tipo cualitativo o cuantitativo en una señal analítica útil. La señal del sensor químico es de naturaleza electrónica, por lo que cambios en la composición o cualidad del analito ocasionan una

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

respuesta en corriente, voltaje, impedancia o conductancia (Menolasina, 2004).

SENSOR ELECTROQUIMICO

Los sensores electroquímicos son una clase de sensores químicos muy simples, que no necesitan de equipos de medida sofisticados; utilizan instrumentación muy común en los laboratorios (potenciómetros y potenciostatos) y la señal traducida es eléctrica, fácilmente procesable por métodos electrónicos. También son fácilmente miniaturizables, lo que permite hacer medidas en pequeños volúmenes de muestra o en zonas de dimensiones reducidas. Presentan unos límites de detección suficientes para una gran mayoría de muestras de interés analítico, y en un intervalo de respuesta más amplio que la mayoría de sensores químicos basados en otros principios. Finalmente un sensor electroquímico, especialmente si se puede fabricar en técnicas de producción en serie, tiene un coste muy bajo, pudiéndose comercializar como dispositivo desechable (Alegret et al, 2004).

www.bdigital.ula.ve

TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

Las técnicas electroquímicas pueden clasificarse dependiendo de la señal de excitación que se le suministra al electrodo de trabajo. Cuando se aplica un potencial a la celda electroquímica la técnica electroanalítica se considera como un método voltamétrico, pero cuando se le aplica una corriente a la celda electroquímica la técnica electroanalítica se considera un método galvanostático. (Menolasina, 2004).

TÉCNICAS VOLTAMPEROMÉTRICAS

Las técnicas voltamperométricas tienen su origen en el año 1922, cuando el químico Jaroslav Heyrovsky desarrolló la polarografía, una técnica

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

voltamperométrica. Las primeras técnicas voltamperométricas tuvieron muchos problemas, que limitaban su viabilidad para el uso diario en la química analítica. En 1942 Hickling construyó el primer potenciostato de 3 electrodos. Los años 1960 y 1970 fueron testigos de muchos avances en la teoría, la instrumentación, y la introducción de sistemas añadidos y controlados por computadoras. Estos avances mejoraron la sensibilidad y crearon nuevos métodos analíticos. La industria respondió con la producción más barata de potenciostatos, de electrodos, y de las celdas que podrían ser utilizados eficazmente en el trabajo analítico de rutina (George y Henze, 2001).

La voltametría es una familia de técnicas electroanalíticas en las que se aplica un determinado potencial eléctrico a un electrodo (denominado electrodo de trabajo) sumergido en una disolución que contiene una especie electroactiva y se mide la intensidad eléctrica que circula por este electrodo (George y Henze, 2001). Esta técnica utiliza una celda electroquímica con 3 electrodos, uno de trabajo, otro de referencia y otro auxiliar.

www.bdigital.ula.ve

Las distintas técnicas voltamperométricas que existen se diferencian básicamente entre sí en la función potencial que se aplica al electrodo sólido de trabajo. Estas técnicas son: voltamperometría de barrido lineal, voltamperometría cíclica, voltamperometría de pulso normal, voltamperometría de pulso diferencial, voltamperometría de onda cuadrada y voltamperometría de preconcentración y redisolución (Menolasina, 2004).

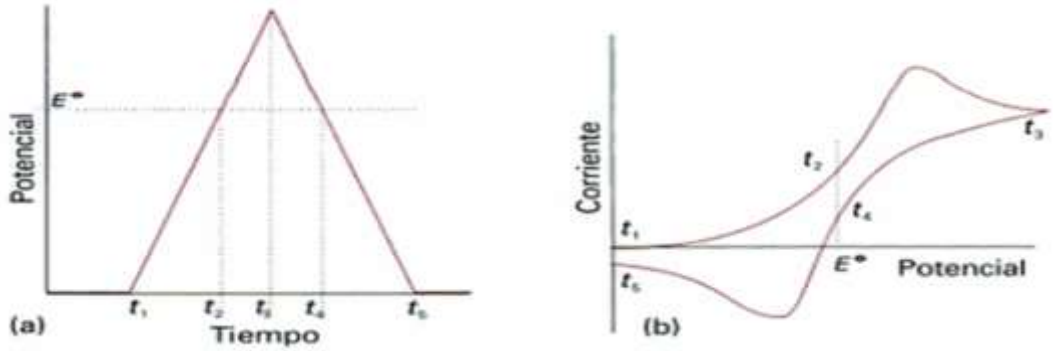
Voltamperometría cíclica (VC):

Esta técnica consiste en la aplicación de un potencial (en forma triangular) que varía linealmente en función de un tiempo determinado a partir de un potencial E_1 hasta un potencial E_2 donde el barrido de potencial se revierte hasta alcanzar nuevamente el valor de E_1. (Menolasina, 2004).

Un voltamperograma cíclico se muestra en la **figura 5** donde la forma de la curva es inicialmente como la de un experimento de barrido lineal pero

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

después de la inversión del barrido hay un rápido cambio de corriente a causa de la alta concentración de especies oxidables cerca del electrodo que fueron generadas en el barrido reductor. Cuando el potencial está cercano al valor requerido para oxidar la especie reducida, hay una importante corriente



anódica hasta que se haya completado toda la oxidación, y la corriente vuelve a cero (Atkins y de Paula, 2008).

Figura 5: a) Cambio del potencial en función del tiempo y b) Curva corriente/potencial resultante en un experimento de voltametría cíclica (Atkins y de Paula, 2008).

www.bdigital.ula.ve

Voltamperometría de pulso diferencial (VPD):

En este tipo de voltamperometría la señal de excitación impuesta al electrodo de trabajo consiste en un tren de pulsos de forma escalonada en el que el potencial inicial que se aplica varia gradualmente con el tiempo y la corriente que se registra en función del tren de pulsos de potencial aplicado es el resultado de la diferencia de las corrientes que se miden antes de la aplicación del pulso y al final del pulso (Menolasina, 2004).

Es decir, en esta técnica no se utiliza un barrido lineal de potencial sino que se aplica una rampa de potencial con las siguientes características: Primero se aplica un potencial constate durante un intervalo de tiempo relativamente amplio, después de ese tiempo, se impone un nuevo pulso de potencial superior al anterior por un intervalo de tiempo muy pequeño y al

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

término de este tiempo se regresa a un potencial superior al de inicio para comenzar otro nuevo ciclo (Baeza y García 2011).

A)

B)

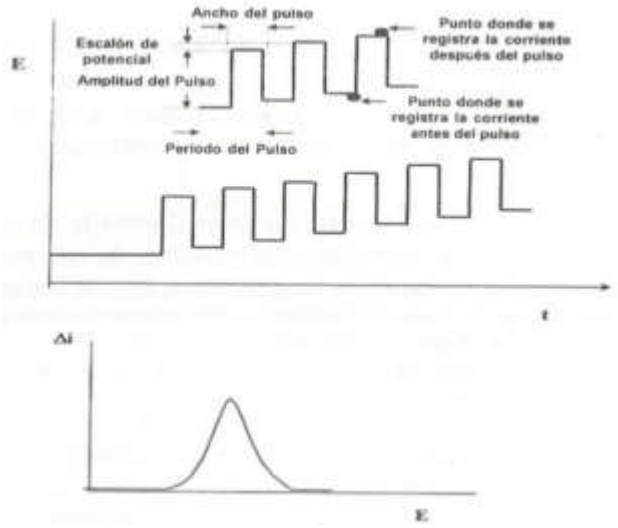


Figura 6: A) Señal de excitación en pulsos de potencial en función del tiempo y B) Respuesta electroquímica a la señal de excitación (Menolasina, 2004).

www.bdigital.ula.ve

COMPONENTES ELECTROQUÍMICOS

Celda electroquímica:

Es un dispositivo en el cual se puede convertir la energía química en energía eléctrica, o viceversa, al ocurrir un proceso redox. Típicamente, una celda electroquímica está constituida por dos o tres electrodos sumergidos en una solución electrolítica en la que una reacción electroquímica, en la interface electrodo-solución, se lleva a cabo. La energía eléctrica que se produce o se consume en una celda electroquímica va acompañada de reacciones de óxido-reducción que se producen simultáneamente (Menolasina, 2004).

Las celdas electroquímicas se clasifican en dos tipos:

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Celda galvánica o pila: es una celda electroquímica cuya reacción química es espontánea y la energía eléctrica generada puede ser convertida en trabajo útil para hacer funcionar otro sistema (Clavijo, 2002). En este sistema se transforma la energía química en eléctrica.

Celda electrolítica: es una celda electroquímica no espontánea; para que ocurra la reacción es necesario aplicar una diferencia de potencial eléctrico del exterior del sistema (Clavijo, 2002). En este sistema se transforma la energía eléctrica en energía química.

Electrodos:

Son dispositivos conductores de la electricidad, los cuales pueden ser estructuras metálicas simples (alambres, laminas) o estructuras complejas (materiales compuestos). Existe una variedad de electrodos con diferentes geometrías. La clasificación de los electrodos depende de la función que van a desempeñar en la celda electroquímica (Menolasina, 2004).

www.bdigital.ula.ve

Electrodo de trabajo:

Es aquel en el cual ocurre la reacción electroquímica de interés en una celda electroquímica. Este debe ser un conductor eléctrico y actuar como una fuente o depósito de electrones por intercambio con moléculas en la interfaz electrodo-solución. Además debe ser inerte electroquímicamente, es decir, no debe generar una corriente en respuesta a un potencial aplicado sobre un amplio intervalo de potencial. Sobre este tipo de electrodo se suele investigar la cinética y el mecanismo de la reacción electroquímica que ocurre en la interfaz de su superficie con la solución electrolítica. También es utilizado para determinar la concentración analítica de especies electroactivas presentes en el medio electrolítico. Entre los electrodos de trabajo más utilizados tenemos los de carbón vítreo, platino, mercurio y oro, los cuales pueden ser modificados química o electroquímicamente para

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

producir sensores específicos para determinadas sustancias de interés científico (Menolasina, 2004).

Electrodo de referencia:

Es aquel que se utiliza para controlar el potencial en el electrodo de trabajo, y se caracteriza por poseer un potencial constante, es decir, que no varía con el tiempo. En una celda electroquímica, el paso de corriente a través de un electrodo puede alterar su potencial (Menolasina, 2004).

Es por esto que una de las características principales que debe presentar un electrodo de referencia, es que sea no polarizable, es decir, que su potencial no se vea alterado como consecuencia de los cambios en la interfase, debido al paso de una corriente apreciable (Villarreal y Bello, 1975). Es por esto que se usan tres electrodos en un sistema electroquímico, uno de referencia, uno de trabajo y otro auxiliar o contraelectrodo.

Este tipo de electrodo esta generalmente constituido por cuatro partes, una parte externa inerte que representa el cuerpo del electrodo, un elemento de referencia, un electrolito y una membrana que sirve de unión liquida. En el cuerpo del electrodo se almacena el electrolito de referencia. El elemento interno de referencia es normalmente un electrodo de metal recubierto con una sal. Los más comunes son el plata/cloruro de plata y el electrodo de calomel saturado. El electrodo de Ag/AgCl es el más utilizado por su fácil construcción y por poseer un intervalo de temperatura de operabilidad alto (130°C) (Menolasina, 2004).

www.bdigital.ula.ve

Electrodo auxiliar: o contraelectrodo consiste generalmente en un alambre de platino, el cual se utiliza para que la corriente que se origina en la celda electroquímica pase a través de éste y el electrodo de trabajo, y no por electrodo de referencia, para así evitar su polarización. Para conseguir esto, la superficie del electrodo auxiliar debe ser mucho más grande que la superficie del electrodo de trabajo. Durante un experimento electroquímico una reacción redox se desarrolla en la superficie del electrodo auxiliar para

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

balancear la reacción que se desarrolla en la superficie del electrodo de trabajo y los productos de esta reacción pueden difundir hacia el electrodo de trabajo e interferir con la reacción redox que ocurre en superficie (Menolasina, 2004).

EVAPORACION DEL SOLVENTE (DROP-CASTING)

El método más fácil de química húmeda para producir láminas finas de moléculas, es el método de drop-casting **(Figura 6)** que trivialmente consiste en disolver un sustrato en un solvente volátil, goteando una cantidad de esta solución sobre una superficie y dejando que el solvente se evapore. Si el solvente ha sido seleccionado (considerando su polaridad) tomando en cuenta la naturaleza hidrofóbica de la superficie se puede alcanzar una humedad completa de esa superficie. Si se han usado soluciones muy diluidas es estadísticamente posible lograr una deposición homogénea. Obviamente la interacción entre la superficie y las moléculas deben ser más largas que la interacción intermolecular con el fin de evitar problemas de agrupamiento. Generalmente estas interacciones no son específicas y no se producen enlaces químicos reales entre la superficie y las moléculas (Mannini, 2008).

www.bdigital.ula.ve

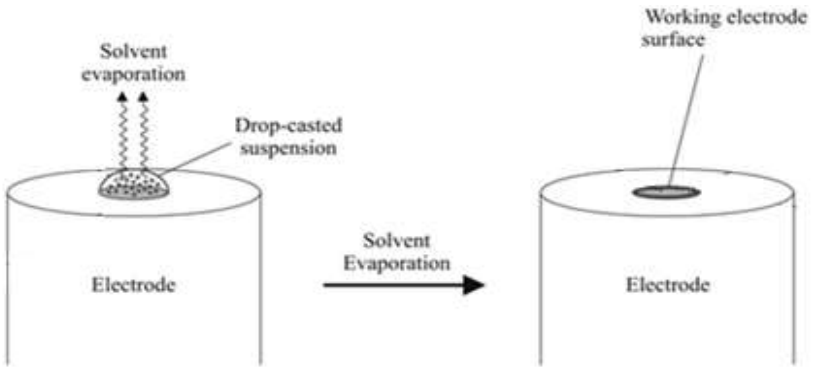


Figura 7: Evaporación del solvente (drop-casting) (Randviir et al, 2014).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Capítulo III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de investigación

El tipo de investigación señala el grado de profundidad, el tipo de resultado y está en concordancia con el objetivo general (Hurtado, 2010).

Investigación proyectiva:

Este tipo de investigación es proyectiva, ya que con este proyecto el investigador trata de solucionar, mediante la creación o diseño de un instrumento más práctico, la problemática que existe con muchos métodos o/y técnicas en la detección rápida y confiable del AU en diversas muestras médicas. Cabe destacar que una investigación proyectiva es aquella que tiene como objetivo diseñar y crear propuestas dirigidas a resolver una determinada situación (Hurtado, 2010).

www.bdigital.ula.ve

Diseño de la investigación

El diseño de la investigación tiene que ver con los procedimientos específicos para recoger los datos (fuentes, tiempo y cantidad de eventos de estudio). Ejemplos: diseño de campo, diseño documental, diseño experimental, diseño evolutivo, entre otros (Hurtado, 2010).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

El diseño de la investigación también se puede definir como la estrategia que adopta el investigador para responder al problema planteado (Arias, 1999). El diseño de esta investigación, según los conceptos anteriores, pertenece a un diseño de campo.

MATERIALES Y METODOS

Materiales e instrumentos:

- Celda electroquímica con 3 electrodos:
  - Electrodo de trabajo de carbón vítreo **(CV)**
  - Electrodo de referencia de plata/cloruro de plata saturado (Ag/AgCl sat.)
  - Contraelectrodo o electrodo auxiliar de alambre de platino.
- Potenciostato/Galvanostato AutoLab PGSTAT12
- Tela pulidora - Espátula - Papel parafilm
- Balones aforados de diferentes volúmenes.
- Pipetas volumétricas para volúmenes de 1, 5, 10mL.
- Pipetas automáticas de 5 a 100 µL y sus puntillas

www.bdigital.ula.ve



Figura 8: a) Electrodo de trabajo de carbón vítreo, b) Contraelectrodo de alambre de platino, c) electrodo de referencia Ag/AgCl saturado

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)



www.bdigital.ula.ve

Figura 9: Sistema electroquímico

Reactivos:

- Ácido úrico **(Sigma)**
- Ácido ascórbico **(Riedel-de Haën ®)**
- Etanol Absoluto **(J. T. Baker)**
- Rutina **(Merck)**
- $HAuCl_4.4H_2O$ **(Merck)**
- Hidróxido de sodio **(Merck)**
- Citrato de sodio **(Riedel-de Haën ®)**
- $NaHCO_3$ **(Riedel-de Haën ®)**
- Alúmina de 0,3 y 0,05 micrometros **(LECO® Corporation)**
- Ácido perclórico **(Sigma & Aldrich)**
- Soluciones buffer de diferentes pH

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

LIMPIEZA DEL MATERIAL

Material de vidrio:

El material de vidrio se lava con solución de ácido nítrico al 10% v/v, con el fin de eliminar impurezas orgánicas y otros residuos presentes, luego se enjuaga con abundante agua desionizada 18 MΩ. y por último se seca en una estufa y se guarda en bolsas de plástico con cierre hermético hasta el momento de su uso.

Limpieza del ECV:

1) **Limpieza mecánica:** Se limpia la superficie del electrodo con etanol luego se pule con alúmina de 0,3 y 0,05 micras por dos minutos en cada una seguidamente se lava con abundante agua desionizada 18 MΩ para proceder a colocarlo en un baño de ultrasonido en etanol y en agua desionizada 18 MΩ por dos minutos en cada uno.

www.bdigital.ula.ve

2) **Limpieza electroquímica:** se cicla el electrodo tratado anteriormente, en una solución de $HClO_4$ 0,1 M en una ventana de potencial de -0,2 a 1,6 V vs. Ag/AgCl sat. a una velocidad de barrido de 100 mV/s por 10 ciclos.

PREPARACION DEL SENSOR ELECTROQUIMICO

Para diseñar el sensor electroquímico se modificó la superficie del electrodo de carbón vítreo con rutina y AuNPs (AuNPs/Ru/CV), la preparación de estas soluciones y su metodología se describen a continuación:

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Solución de Rutina

Se preparó una solución de rutina $3x10^{-2}$ M con etanol; para eso se pesó la cantidad adecuada de rutina (Ru) y se mezcló con etanol agitándose durante unos minutos hasta que la rutina se disolviera y se enraso hasta el volumen deseado con etanol. Esta solución fue almacenada a una temperatura de 4°C.

Nanopartículas de oro

Para la síntesis de AuNPs se siguió el método de Turkevich modificado por Frens donde se añadió una cantidad determinada de ácido tetracloroaurico ($HAuCl_4$) 0.01% en un vaso de precipitado aplicándole calor y agitando vigorosamente hasta ebullición, seguidamente se le añadió a la solución citrato de sodio y sin retirar la fuente de calor se esperó un cambio de color en la solución, luego se dejó enfriar y se comprobó el diámetro promedio de las AuNPs en un espectrofotómetro UV-Vis JENWAY. Estas AuNPs fueron almacenadas en viales ámbar a una temperatura de 4°C.

www.bdigital.ula.ve

Electrodeposición de la rutina en el carbón vítreo (CV)

Una vez que el ECV fue limpiado mecánica y electroquímicamente, previamente activado en una solución de bicarbonato de sodio 0,1 M, ciclando de -1,1 a 1.6 V Vs Ag/AgCl Sat. A 100 mV/s, este electrodo activado se sumerge en una celda electrolítica con una solución de Ru 3 mM/ácido fosfórico 0,1M, se purga con N_2 por un minuto y seguidamente se realizan barridos a una velocidad 25 mV/s utilizando la técnica de VC con una ventana de potencial de -0,2 a 0,75 V Vs Ag/AgCl Sat.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Adsorción de AuNPs por evaporación del solvente (Drop-casting)

Una vez que la rutina se ha electrodepositado, se procede a adsorber las AuNPs sobre la superficie electródica del carbón vítreo modificado con rutina (Ru/CV), colocando 5 µL. de AuNPs y dejando que el solvente se evapore a temperatura ambiente, este paso se realizó 3 veces.

PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR ELECTROQUÍMICAMENTE AU

Solución de trabajo

La solución de AU se preparó añadiendo una cantidad de AU en agua desionizada y se le agrego una pequeña cantidad de hidróxido de sodio facilitando así la disolución completa del AU. Esta solución fue almacenada a una temperatura de 4°C.

www.bdigital.ula.ve

Para la determinación de AU, se utilizó buffer fosfato salino (BFS) 0,1 M + KCl 0,1 M pH 6,0. A este medio se le añadieron cantidades de la solución de trabajo de manera que en la celda electroquímica se encontrara la concentración de AU deseada.

Para estudiar el comportamiento electroquímico de la solución de trabajo se utilizó la técnica de VC ajustando los parámetros necesarios hasta encontrar las condiciones experimentales adecuadas; una vez hecho esto se pudo estudiar la respuesta electroquímica del AU por VPD.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Capítulo IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de las AuNPs

Las AuNPs fueron sintetizadas a partir de citrato de sodio y se caracterizaron en cuanto a tamaño, forma y estabilidad utilizando la técnica de espectroscopia UV-Vis.

El método de reducción de metales nobles es el más simple y el más común para la síntesis de AuNPs, se basa en la reducción acuosa del $HAuCl_4$ mediante citrato de sodio, el cual es utilizado tanto como agente reductor como agente estabilizante (Viudez, 2011); este mecanismo de formación de nanopartículas se basa primero en la reducción de la sal metálica al correspondiente átomo metálico cerovalente; estos átomos actúan como centros de nucleación dando lugar a racimos atómicos cuyo crecimiento continúa a medida que se mantenga el suministro de átomos, formándose así la partícula. Sin embargo, son sólo estables cinéticamente, por esta razón es necesario estabilizar las partículas y para eso se envuelven de moléculas estabilizadoras que se adsorben en la superficie de la partícula y de esta manera se previenen la aglomeración (Rodríguez y Saddys, 2007).

www.bdigital.ula.ve

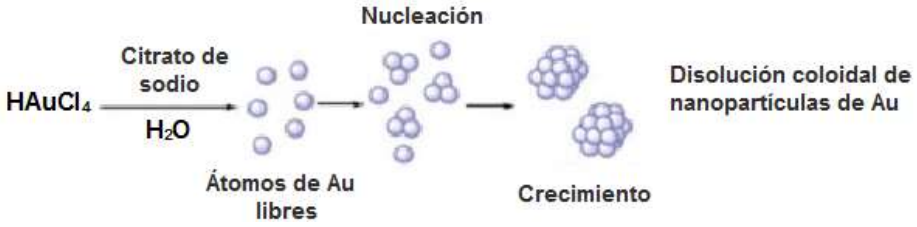


Figura 10: Formación de nanopartículas de oro

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Las AuNPs que son sintetizadas a partir de citrato de sodio son esferas monodispersas que tienen una carga superficial negativa, aportada por los aniones citratos débilmente enlazados y permitiendo caracterizarlas fácilmente por la absorción del plasmón (Viudez, 2011).

Para entender ese término debemos saber que en los metales existe una gran cantidad de electrones que no se encuentran enlazados a un núcleo atómico, esto les permite moverse libremente dentro del material formando un plasma y con la aplicación de campos eléctricos, estos electrones fluyen a través del material dando lugar al fenómeno de la conducción eléctrica (Luna et al, 2013).

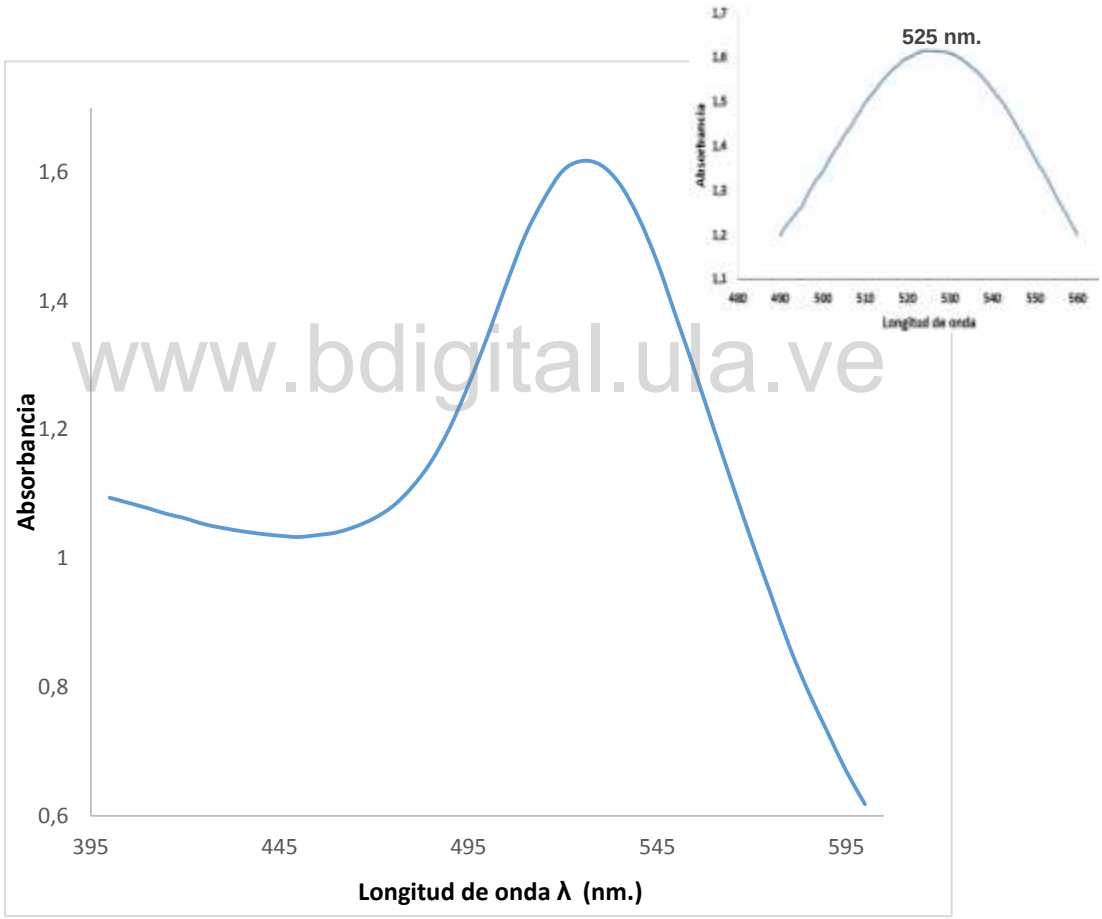
Cuando se hace incidir radiación electromagnética sobre los metales, se pueden inducir excitaciones colectivas de los electrones libres, denominadas plasmones. Estas ondulaciones electrónicas se pueden propagar en la interfase de un metal y un material dieléctrico dando lugar a un plasmón superficial. Cuando la frecuencia de la radiación incidente coincide con la frecuencia resonante de la oscilación colectiva de los electrones de conducción, se produce un fenómeno de absorción. En el caso de metales con baja dimensionalidad (películas delgadas y metales nanométricos), la resonancia del plasmón presenta una frecuencia característica fuertemente dependiente del tamaño y forma del material debido a efectos de confinamiento.

www.bdigital.ula.ve

En el caso de las nanopartículas de los metales nobles como el oro y la plata, la banda de extinción de la resonancia del plasmón cae dentro del espectro visible, de modo que estas nanopartículas presentan colores diferentes a los observados en sus análogos macroscópicos y que pueden variar según el tamaño de partícula (Luna et al, 2013).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Las nanopartículas, específicamente las de oro presentan una banda de absorción del plasmón en el espectro UV-Visible y en un rango de longitud de onda entre 510-550 nm. (Ríos et al, 2012). El método utilizado en esta investigación nos permitió obtener AuNPs monodispersas de un tamaño aproximado de 16 a 20 nm, ya que los espectros UV-Vis analizados presentaron una sola banda de absorción del plasmón centrada a 525 nm que se muestra en la figura 10.



www.bdigital.ula.ve

Figura 11: Espectro de absorción UV-Vis de la suspensión coloidal de nanopartículas de oro.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Caracterización del electrodo de carbón vítreo

Determinación del factor de rugosidad y del área real

En esta investigación se utilizó un electrodo de trabajo de carbón vítreo (CV) debido a su disponibilidad en el laboratorio y asimismo porque este material presenta características como grado de oxidación muy bajo, alta inestabilidad química, poros de pequeño tamaño, impermeabilidad a gases y líquidos, es inerte químicamente, bajo ciertas condiciones presenta amplias ventanas de potencial, tiene baja corriente de fondo y además presenta una superficie química diversa en grupos funcionales que hace que se pueda modificar su superficie electródica con diversos compuestos (Uslu y Ozkan, 2007). En la Figura 12 se puede observar la respuesta electroquímica característica del CV luego de ser limpiada su superficie mecánicamente con alúmina y electroquímicamente en una solución de $HClO_4$ 0,1 M. a una velocidad de 100 mV/s, en una ventana de potencial de -0,2 a 1,6 V. por diez ciclos, el voltamperograma muestra un aumento de corriente a partir de 1,20 V, producto de la oxidación de los grupos funcionales y posteriormente la descomposición del medio electrolítico. Esta limpieza se realizó antes de llevar a cabo cada uno de los experimentos realizados en esta investigación.

www.bdigital.ula.ve

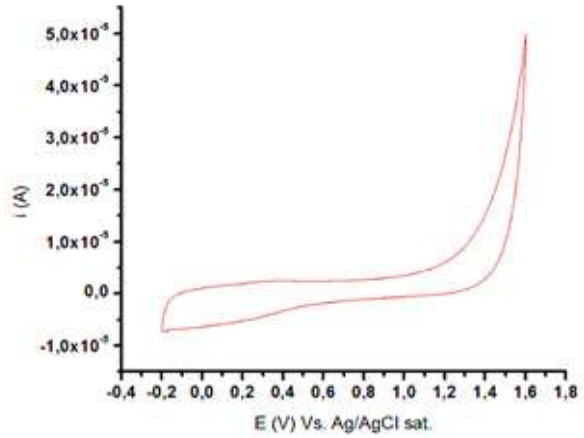


Figura 12: Respuesta electroquímica del electrodo de CV en HClO4 0,1 M

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Luego de la limpieza electroquímica se procede a evaluar el comportamiento del electrodo, en una solución de KNO_3 0,1 M con ferro ferricianuro $[Fe(CN)_6]^{-4}$ $[Fe(CN)_6]^{-3}$ $5x10^{-3}$ M, por VC en una ventana de potencial de -0,2 a 0,6 V. a una velocidad de 50 mV/s. Este paso se realizó con la finalidad de obtener los datos necesarios para calcular el área efectiva y el factor de rugosidad del CV mediante las siguientes ecuaciones:

1)

$$FR = \frac{I_{pa\ (Exp)}}{I_{p(teórico)}}$$

2)

$$\mathbf{A_{efectiva}} = FR \times A_{geométrica}$$

3) $$I_{p(teórico)} = (2.69x10^5)\, n^{3/2}\, D^{1/2}\, v^{1/2}\, AC$$

www.bdigital.ula.ve

Donde en la ecuación (1) Factor de Rugosidad el:

$I_{pa(Exp)}$: es el valor de la corriente del pico de oxidación del ión $[Fe(CN)_6]^{-4}$ el cual se puede observar en la figura 13.

$I_{pa(teórico)}$: es la corriente calculada a partir de la ecuación de Randles-Sevcik (3) (Menolasina et al, 2009).donde:

n: es el número de electrones transferidos (n = 1).

D: es el coeficiente de difusión del ión (D = $7,6x10^{-6}$ cm^2/s) (Menolasina et al, 2009).

v: es la velocidad de barrido (0.05 V/s).

A: es el área geométrica del CV (0.0707 cm^2)

C: es la concentración del ión $[Fe(CN)_6]^{-4}$ ($5x10^{-3}$ M)

Una vez realizados los cálculos se obtuvo que el $I_{pa(Exp)}$ = $6,64x10^{-5}$ A, el $I_{pa(teórico)}$ = $3,61x10^{-5}$ A dando como resultado un FR de 1.84 y un área efectiva de 0.13 cm^2

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

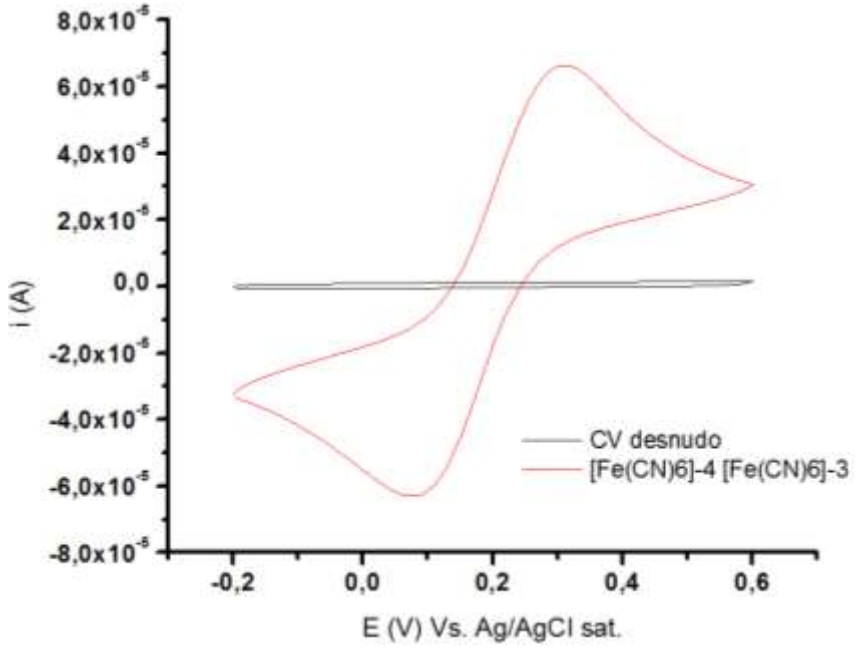


Figura 13: Comportamiento del CV en KNO_3 0,1 M con $[Fe(CN)_6]^{-4}$ $[Fe(CN)_6]^{-3}$ $5x10^{-3}$ M a 50 mV/s.

www.bdigital.ula.ve

Preparación del sensor electroquímico

Electrodeposición de Rutina

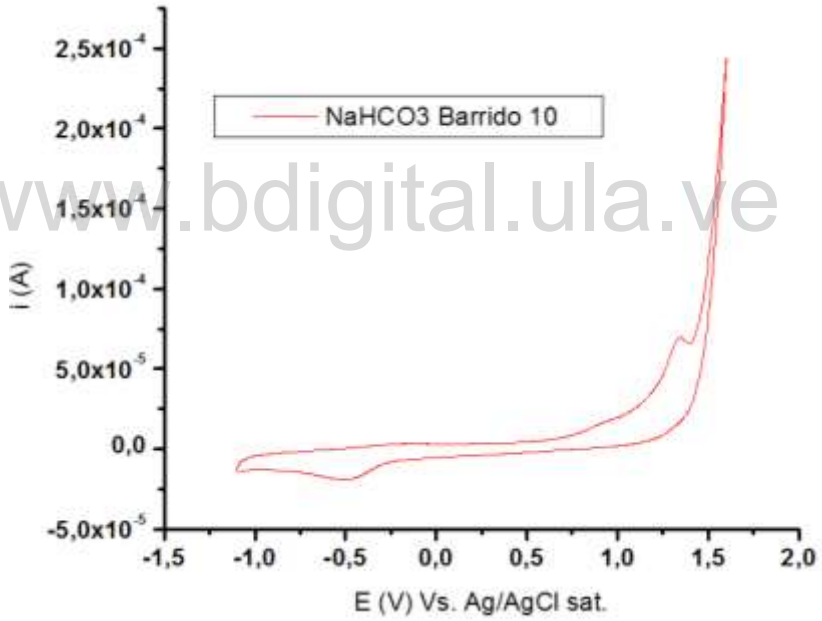
Una vez realizada la limpieza del CV anteriormente descrita, se debe activar el electrodo en una solución de bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) para luego electrodepositar la Ru.

Para la activación se sumerge el electrodo en $NaHCO_3$ 0,1 M por medio de VC en una ventana de potencial de -1,1 a 1,6 V vs Ag/AgCl sat. a una velocidad de 100 mV/s. por diez ciclos. Esta etapa es muy importante ya que con la activación se modifica la superficie del electrodo con grupos funcionales específicos (carbonilo, carboxilo, hidroxilo o quinonas) los cuales son responsables de mejorar el rendimiento del CV. Estos actúan como

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

mediadores entre el electrodo y las especies electroactivas durante el proceso de transferencia de electrones. La activación electroquímica del CV en $NaHCO_3$ 0,1 M se utilizó debido a su simplicidad y también porque conduce a un aumento de la concentración de sitios activos sobre la superficie del electrodo que promueve la inmovilización de especies electroactivas; así como también aumenta considerablemente la tasa de transferencia de electrones heterogéneos para varios sistemas redox (Da Silva et al, 2008).

En la figura 14 podemos ver la respuesta del CV activado electroquímicamente con $NaHCO_3$ 0,1 M, observándose un pico anódico a 1,25 V el cual es producto de la oxidación del $NaHCO_3$.



www.bdigital.ula.ve

Figura 14: Respuesta electroquímica del CV activado con $NaHCO_3$ 0,1 M

Seguido de la activación se procedió a electrodepositar la película de Ru, donde se sumerge el CV en una solución de ácido fosfórico 0,1 M (H_3PO_4 0,1 M) con Ru $1x10^{-3}$ M mediante VC en una ventana de potencial de -0,2 a 0,75 V vs Ag/AgCl sat. a una velocidad de 25 mV/s. por 10 ciclos. Para que la electrodeposición de Ru se realice de manera correcta se debe tomar en

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

cuenta el pH de la solución electrolítica, ya que varios investigadores han estudiado el efecto que tiene el pH en la oxidación de la rutina, donde se observó que a medida que el pH aumentaba la corriente de pico anódico y catódico disminuía (Jing An, 2013) comprobando que el medio ácido es el más conveniente para la oxidación de la rutina (Jian Bo-He et al, 2007).

Asimismo el mecanismo de electrodeposición de la rutina depende de su estructura ya que cuando se usa un CV activado con $NaHCO_3$ como plataforma para la electrooxidación de la rutina, los grupos carboxilo e hidroxilo de la superficie activada del electrodo se comportan como nucleófilos contra la o-quinona, es decir, los grupos funcionales activos que se encuentran en la superficie electródica, atacan la posición 6' de la forma oxidada de Ru (Figura 15), que desempeña el papel de un aceptor de Michael. Este proceso conduce a la formación de enlaces químicos entre la forma oxidada de la Ru y los grupos tensioactivos, dando como resultado la inmovilización de Ru sobre la superficie del CV activado con $NaHCO_3$ (Ghica y Oliveira, 2004). Este proceso se puede observar en la figura 16 donde vemos el mecanismo propuesto por Cheng y colaboradores que explica la inmovilización de la Ru, donde el anillo de catecol (a) se oxida hasta o-quinona (b) para luego reaccionar con los hidroxilos de la superficie activada y una vez inmobilizada en el CV, el anillo catecol mantiene la actividad de oxidoreducción.

www.bdigital.ula.ve

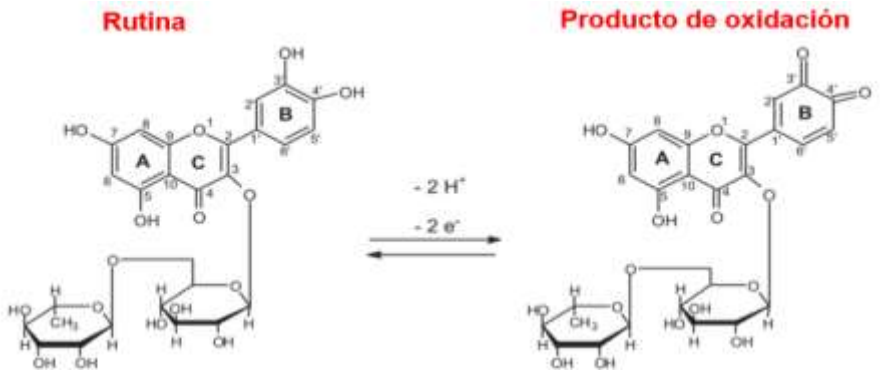


Figura 15: Forma oxidada de la rutina (dos Santos et al, 2008).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

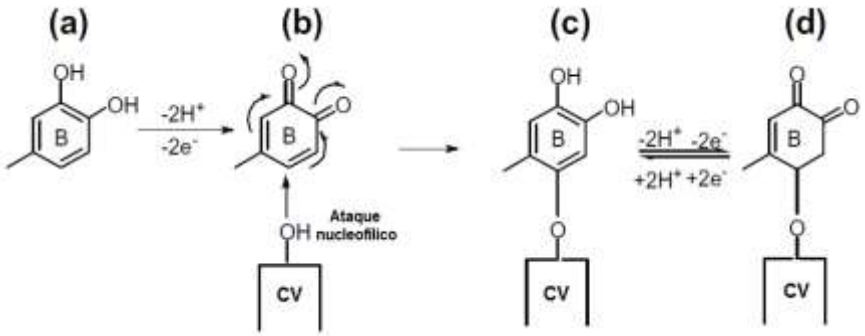


Figura 16: Mecanismo de inmovilización de la rutina sobre CV (Cheng et al, 2012).

En la figura 17.A podemos ver la respuesta electroquímica del CV activado con $NaHCO_3$, en una solución de H_3PO_4 0,1 M con rutina $1x10^{-3}$ M donde se observa un pico anódico a 0,55 V y un pico catódico a 0,50 V que corresponden a la oxidación y reducción de la rutina respectivamente y en la figura 17.B se observa un voltamperograma cíclico de la respuesta del Ru/CV en una solución de BFS 0,1 M + KCl 0, 1 M pH 6,0 donde se confirma que la película de Ru se ha depositado en la superficie electródica.

www.bdigital.ula.ve

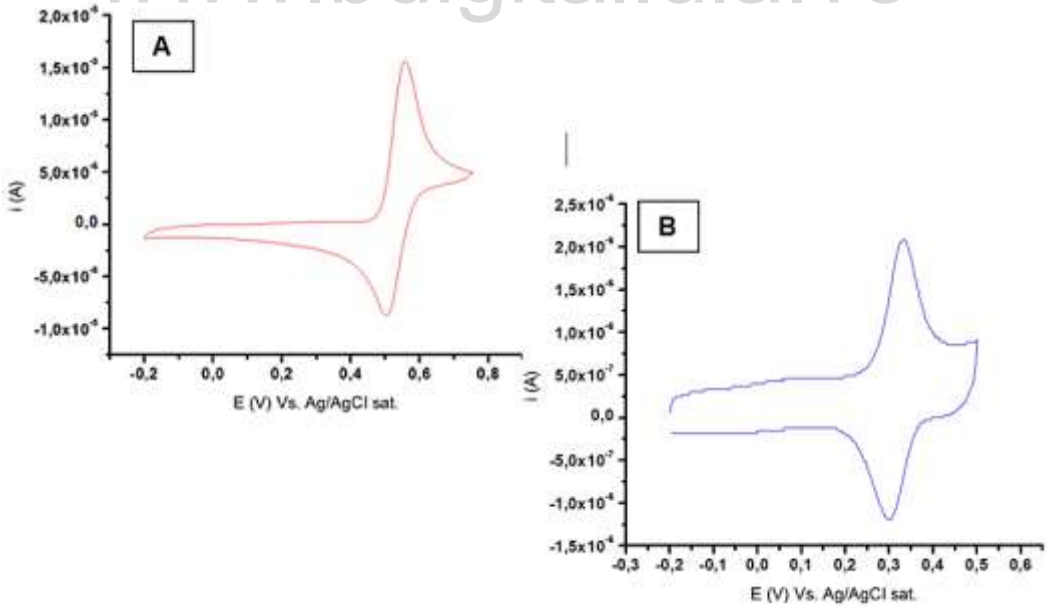
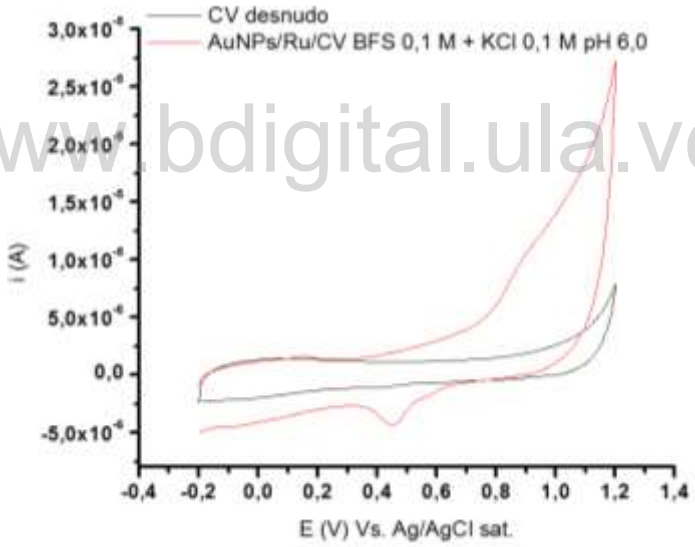


Figura 17: (A) Respuesta electroquímica del CV en H_3PO_4 0,1 M con rutina $1x10^{-3}$ M y (B) Respuesta electroquímica del Ru/CV en BFS 0,1 M + KCl 0,1 M pH 6,0

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Adsorción de AuNPs por evaporación del solvente (Drop-casting)

Una vez modificada la superficie electródica con Ru se procede a adsorber las AuNPs sobre el Ru/CV por medio de la técnica evaporación del solvente (Drop-casting) donde se colocan 5 µL. de AuNPs sobre el Ru/CV y se deja a temperatura ambiente hasta que el solvente se evapore completamente, este paso se realizó 3 veces seguidas En la figura 18 se puede observar la respuesta electroquímica del AuNPs/Ru/CV en una solución BFS 0,1 M + KCl 0,1 M pH 6,0. en una ventana de potencial de -0,2 a 1,2 V vs. Ag/AgCl sat. a 100 mV/s. utilizando VC, donde se aprecia un pico catódico a 0,450 V producto de la reducción de óxidos de oro, evidenciando así la presencia de las AuNPs sobre la superficie del CV.



www.bdigital.ula.ve

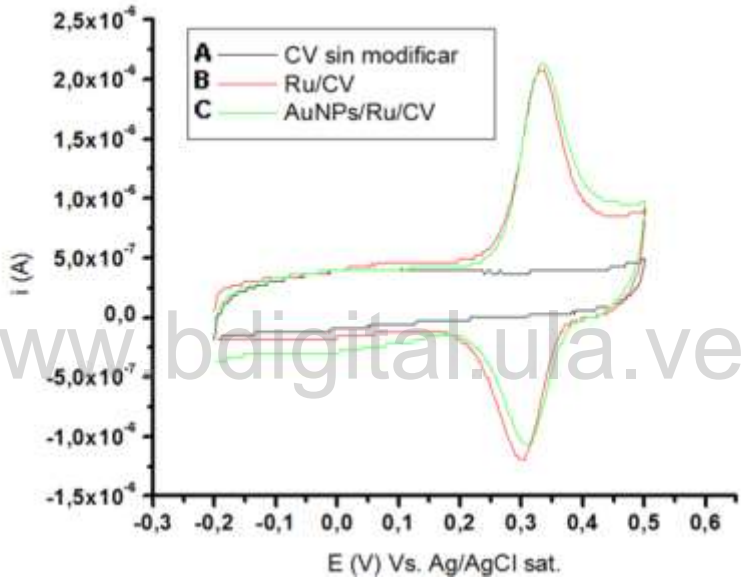
Figura 18: AuNPs/Ru/CV en una solución BFS 0,1 M + KCl 0,1 M pH 6,0

Comportamiento del CV modificado en las diferentes etapas del desarrollo del sensor electroquímico AuNPs/Ru/CV

En la figura 19 se observa el comportamiento del CV sin modificar, modificado con Ru y modificado con Ru y AuNPs en una solución de BFS 0,1

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

M + KCl 0,1 M pH 6,0, utilizando VC en una ventana de potencial de -0,2 a 0,5 V vs Ag/AgCl saturado, a 25 mV/s. El voltamperograma obtenido muestra la respuesta característica de la Ru adsorbida en la superficie electródica, la cual se evidencia por los picos anódicos y catódicos (B) que se presentan a 0,33 V y 0,30 V respectivamente, asimismo se observa un cambio en el voltamperograma (C) donde disminuye la corriente de pico catódico, pudiendo asumir que es debido al drop-casting de las AuNPs que tienen ese comportamiento producto de un fenómeno de receptividad de las mismas.



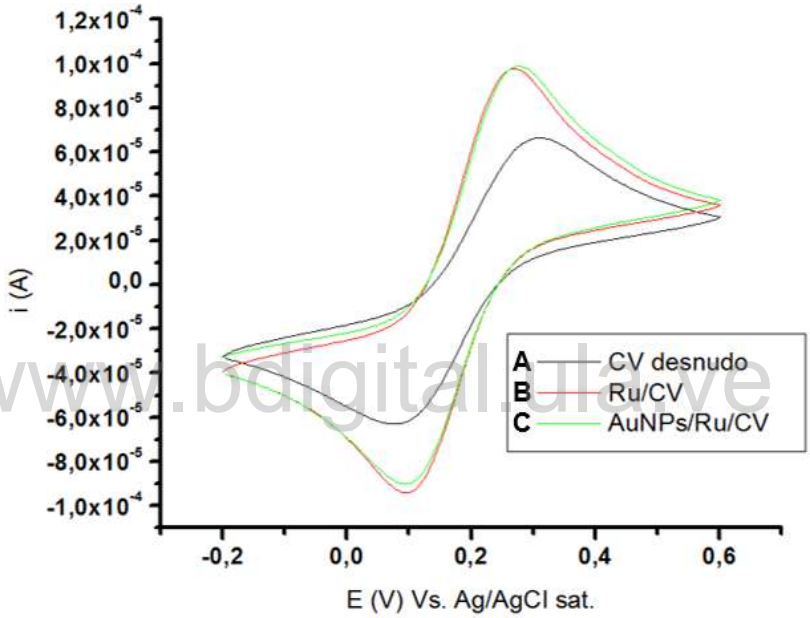
www.bdigital.ula.ve

Figura 19: Comportamiento del CV en BFS 0,1 M + KCl 0,1 M pH 6,0 en sus diferentes etapas de modificación.

Del mismo modo se estudió el comportamiento del CV en las diferentes etapas de modificación anteriormente mencionadas pero en una solución de KNO_3 0,1 M con $[Fe(CN)_6]^{-4}$ $[Fe(CN)_6]^{-3}$ $5x10^{-3}$ M, por VC en una ventana de potencial de -0,2 a 0,6 V. a una velocidad de 50 mV/s. En la figura 20 se puede observar el comportamiento redox reversible del par $[Fe(CN)_6]^{-4}$ $[Fe(CN)_6]^{-3}$, también se puede apreciar como la respuesta electroquímica del CV desnudo (A) no es tan favorable como la del CV modificado con Ru (B),

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

donde hay un aumento de las corrientes de pico, lo que indica que la superficie electródica se vuelve más electroactiva gracias a los grupos –OH de la Ru que quedan expuestos en la superficie del CV, atrayendo fácilmente las moléculas de $[Fe(CN)_6]^{-4}$ $[Fe(CN)_6]^{-3}$; mientras que al comparar la respuesta electroquímica del AuNPs/Ru/CV (C) con la del Ru/CV vemos que no hay un cambio significativo en las corrientes de pico, esto puede deberse a que las AuNPs tienen una carga superficial negativa que dificultad la atracción de los aniones $[Fe(CN)_6]^{-4}$ $[Fe(CN)_6]^{-3}$.



www.bdigital.uc.ve

Figura 20: Comportamiento del CV en las diferentes etapas de modificación en una solución de KNO_3 0,1 M con $[Fe(CN)_6]^{-4}$ $[Fe(CN)_6]^{-3}$ $5x10^{-3}$ M.

En la figura 21 se observa el comportamiento electroquímico del sensor AuNPs/Ru/CV en KNO_3 0,1 M con $[Fe(CN)_6]^{-4}$ $[Fe(CN)_6]^{-3}$ $5x10^{-3}$ M a diferentes velocidades de barrido, donde se puede apreciar el incremento de las corrientes de pico a medida que las velocidades de barrido aumentan. Así como también se muestra la representación de *Ip* frente a $v^{1/2}$ donde se observa un comportamiento lineal lo que indica que el proceso está controlado por difusión.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

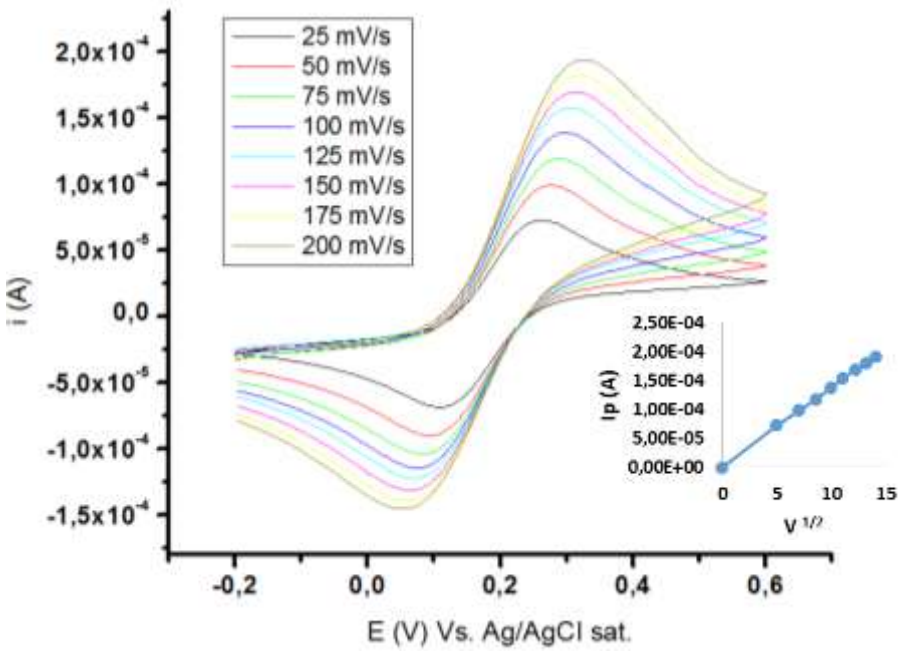


Figura 21: comportamiento electroquímico del AuNPs/Ru/CV en KNO_3 0,1 M con $[Fe(CN)_6]^{-4}$ $[Fe(CN)_6]^{-3}$ 5x10^{-3} M a diferentes velocidades de barrido.

www.bdigital.ula.ve

Comportamiento electroquímico del AuNPs/Ru/CV en presencia de AU y AA

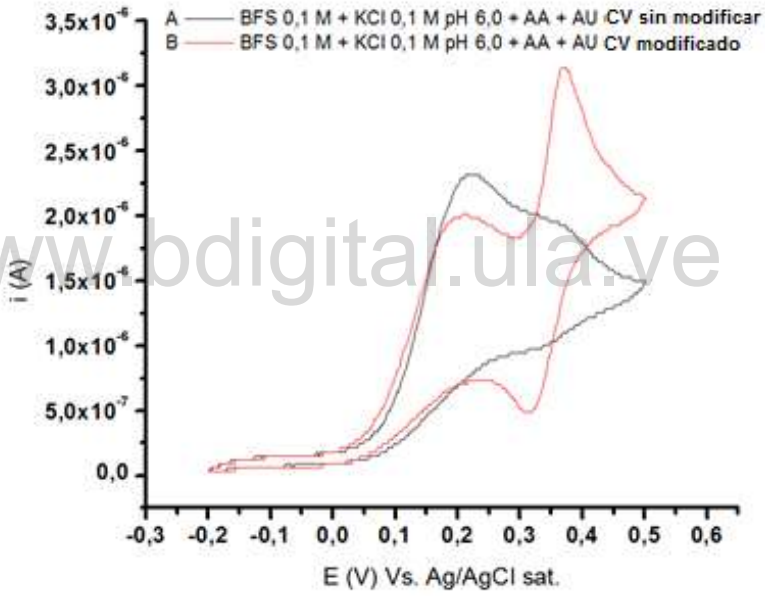
Para estudiar el comportamiento electroquímico del AuNPs/RUT/ECV en presencia de AU y AA se utilizaron las técnicas de VC y VPD tomando en cuenta los siguientes parámetros:

	VC	**VPD**
Ventana de potencial	-0,2 a 0,5 V Vs Ag/AgCl Sat	
Solución electrolítica	BFS 0,1 M + KCl 0,1 M pH 6,0	
Velocidad del barrido	5 mV/segundo	----------
Número de barridos	10 ciclos	----------
Step potencial	0,00244 V	0,00495 V
Amplitud de pulso	----------	0,02505 V

Tabla 1: Parámetros electroquímicos utilizados en VC y VPD para estudiar el comportamiento electroquímico del AuNPs/Ru/CV en presencia de AU y AA.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

La figura 22 muestra la respuesta electroquímica que se obtuvo por VC, donde en A se puede observar un pico anódico a 0,214 V que corresponde a la oxidación del AA y un pico anódico de menor tamaño a 0,367 V que corresponde a la oxidación de la Ru electrodepositada sobre el electrodo, cabe destacar que la Ru tiene una respuesta electroquímica cercana al potencial del AU, debido a esto en B se observa el pico anódico correspondiente al AA y un pico anódico que corresponde a la oxidación del AU al mismo potencial de la Ru. El voltamperograma también muestra que con las modificaciones realizadas al CV, se pudo separar la señal del AA y del AU con una separación de picos de 0,153 V.



www.bdigital.ula.ve

Figura 22: Voltamperograma cíclico de la respuesta electroquímica del AuNPs/Ru/CV en presencia de AU y AA.

La figura 23 muestra la respuesta electroquímica que se obtuvo por VPD donde se observa el mismo comportamiento entre la Ru y el AU (figura 23.A) anteriormente mencionado en el voltamperograma cíclico, del mismo modo se muestra un primer pico de oxidación a 0,092 V correspondiente al AA y un segundo pico de oxidación a 0,319 V correspondiente al AU (figura 23.B), con esta técnica también se logró la

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

separación de las señales del AA y del AU pero con una mayor separación de picos de 0,22 V.

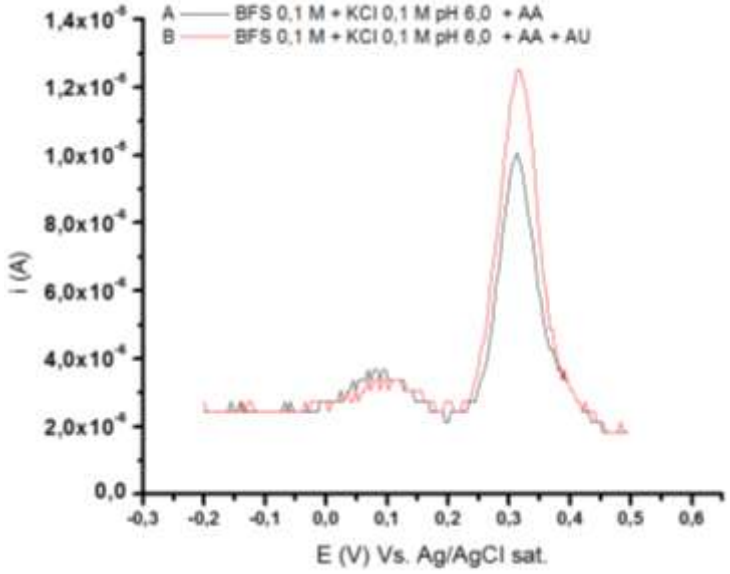


Figura 23: Voltamperograma de pulso diferencial de la respuesta electroquímica del AuNPs/Ru/CV en presencia de AU y AA.

www.bdigital.ula.ve

Comportamiento electroquímico del AuNPs/Ru/CV a diferentes concentraciones de AU

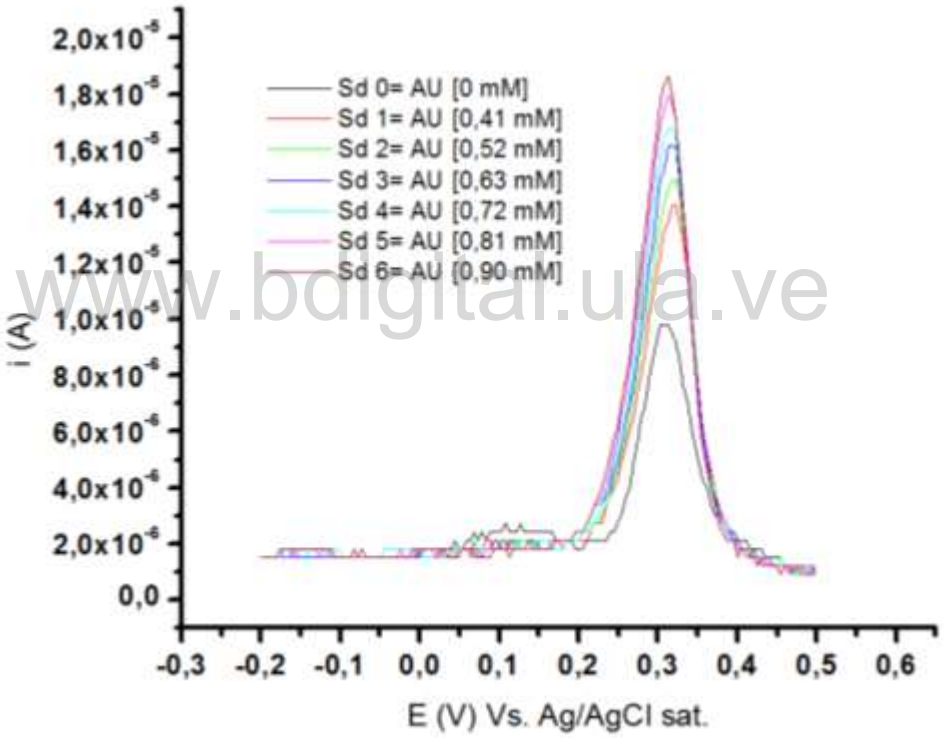
Para estudiar el comportamiento electroquímico del AuNPs/Ru/CV en diferentes concentraciones de AU se utilizó la técnica VPD tomando en cuenta los siguientes parámetros:

	VPD
Ventana de potencial	-0,2 a 0,5 V
Solución electrolítica	BFS 0,1 M + KCl 0,1 M pH 6,0 con un rango de concentraciones de AU, desde un Estándar 1 (Sd 1= AU [0,43 mM]) hasta un Estándar 6 (Sd 6= AU [0,90 mM]).
Step potencial	0,00495 V
Amplitud de pulso	0,02505 V

Tabla 2: Parámetros electroquímicos utilizados en VPD para estudiar el comportamiento electroquímico del AuNPs/Ru/CV en presencia de diferentes concentraciones de AU

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

La figura 24 muestra el voltamperograma que se obtuvo al variar la concentración de AU en la solución electrolítica, donde se observa que a medida que aumentaba la concentración también aumentaba la corriente de pico de oxidación. Este voltamperograma se realizó con el fin de obtener los datos necesarios para elaborar una curva de calibración corriente (A) vs. concentración de AU (mM), que permitió evaluar la respuesta electroquímica lineal del AuNPs/Ru/CV. La figura 25 nos muestra la curva mencionada anteriormente donde se observa el comportamiento lineal de la corriente de pico de oxidación del AU y cuya correlación lineal (r^2) es igual a 0,9996.



www.bdigital.ula.ve

Figura 24: Voltamperograma de pulso diferencial de la respuesta electroquímica del AuNPs/Ru/CV en presencia de diferentes concentraciones de AU

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

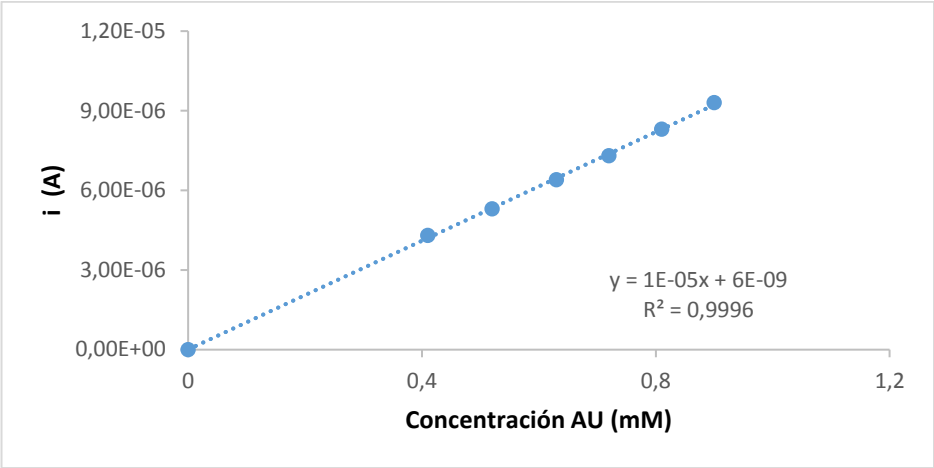


Figura 25: Curva de Calibración corriente (A) vs. Concentración de AU (mM)

Cálculos estadísticos para evaluar el desempeño analítico del sensor electroquímico AuNPs/Ru/CV en la detección de AU

Límite de detección y cuantificación:

www.bdigital.ula.ve

En esta investigación se evaluaron los parámetros que se presentaran a continuación utilizando los siguientes datos:

Blancos medidos en BFS 0,1 M + KCl 0,1 M pH = 6,0	**Corriente (A)**
1	$0,52x10^{-5}$
2	$0,46x10^{-5}$
3	$0,49x10^{-5}$
4	$0,43x10^{-5}$
5	$0,46x10^{-5}$
6	$0,43x10^{-5}$
7	$0,46x10^{-5}$
8	$0,52x10^{-5}$
9	$0,49x10^{-5}$
10	$0,46x10^{-5}$
Media = $4,72x10^{-6}$ DE= $3,22x10^{-7}$ Pendiente de CC pH 6 = $1x10^{-5}$ A/mM	

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Límite de detección (L_D): se puede definir como aquella concentración del analito que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal del blanco o ruido de fondo. Aunque también se puede definir como la concentración del analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco más tres veces la desviación estándar del blanco (Miller y Miller, 2002).

$$L_D = \frac{3 \times DE}{m}$$

Donde:

DE: es la desviación estándar de los blancos y

m: es la pendiente de la curva de calibración presentada en la figura 25

Límite de cuantificación (L_Q): se puede definir como la cantidad o concentración mínima que, bajo las condiciones experimentales establecidas, puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión (Menéndez, 2008). También se puede definir como la concentración del analito que da una señal diez veces la desviación estándar del blanco (Contento, 1997).

www.bdigital.ula.ve

$$L_Q = \frac{10 \times DE}{m}$$

Con los datos mostrados en la tabla anterior, de los blancos medidos en diferentes días (ICH, 1995). se obtuvo un L_D de 0,097 mM y un L_Q de 0,32 mM.

Zhang y colaboradores modificaron un electrodo de CV con dodecil sulfato de sodio y nanotubos de carbón de pared múltiple (SDS-MWCNTs), cuyo L_D fue $4{,}0 \times 10^{-5}$ mM comparado con el de esta investigación, ellos lograron una mayor sensibilidad, la cual puede ser debido a que utilizaron una suspensión que contenía ambos modificadores, SDS y MWCNT, previamente acidificados y utilizaron luz infrarroja para secar la solución sobre la superficie del electrodo, lo que posiblemente favoreció la adsorción

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

del SDS-MWCNT, aumentado así el área superficial electroactiva del electrodo.

Debido a que el sensor expuesto en esta investigación se ideo con el fin de detectar AU en muestras de orina no es necesario obtener un límite de detección tan bajo ya que la concentración del mismo es de aproximadamente 2 mM, lo que quiere decir, que en el método propuesto por Zhang y colaboradores se tendría que diluir la muestra en exceso para obtener valores que estén dentro de su rango de concentraciones, además los nanotubos de carbono tienen un costo elevado debido a su producción.

Deng Pan y colaboradores modificaron un electrodo de CV con puntos cuánticos de teluro de cadmio (CdTe) y lograron obtener un L_D de $1x10^{-4}$ mM, pero Deng Pan y colaboradores tuvieron la misma desventaja que los investigadores anteriormente mencionados ya que al momento de utilizar el sensor en una muestra problema (en su caso suero) debieron diluir la muestra por lo menos 20 veces antes de realizar la medición, siendo necesaria una evaluación del paralelismo del método analítico.

www.bdigital.ula.ve

Meenakshi y Pandian modificaron un electrodo de CV con nanotubos de haloisita modificados con ácido carboxílico de ferroceno, obteniendo un L_D para el AU de $3x10^{-3}$ mM. Tal como en las investigaciones anteriormente mencionadas, en el trabajo de Meenakshi y Pandian se tuvo que diluir la muestra excesivamente antes de realizar la medición en una muestra problema.

Khasanah y colaboradores desarrollaron un sensor utilizando un electrodo de CV, el cual modificaron con zeolita impresa y lograron obtener un L_D de $5,9x10^{-9}$ mM, esta sensibilidad fue atribuida a que la zeolita aparte de tener una estructura muy porosa, fue sintetizada con AU para obtener el radio

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

molecular del mismo, lo que llevo a incrementar la capacidad de adsorción de la zeolita. El desarrollo de este sensor requiere de varios días, comparado con el sensor desarrollado en esta investigación el cual requiere pocas horas para su fabricación.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CONCLUSIÓN

El desarrollo del sensor electroquímico basado en AuNPs soportadas en Ru presento una excelente respuesta en la detección del AU ya que con las modificaciones realizadas al sensor se pudo separar la señal analítica del AU y de la sustancia interferente (AA). Presentando una linealidad aceptable en un rango de concentraciones de 0,41 mM a 0,90 mM, un límite de detección de 0,092 mM y un límite de cuantificación de 0,32 mM.

Se pudo comprobar que los materiales nanométricos específicamente las AuNPs y sustancias naturales como los flavonoides son excelentes para la creación de sensores electroquímicos ya que les aportan mayor selectividad y sensibilidad debido a sus propiedades electrocatalíticas. Por otro lado, ni el proceso de síntesis de las AuNPs ni de la obtención de Ru son procesos complejos; además de esto, la cantidad utilizada de ambas sustancias en la modificación del electrodo de CV es poca en comparación con otros métodos también utilizados en la determinación de AU. Otra importancia que se le da a estas sustancias es que no son toxicas ni para el humano ni para el ambiente.

www.bdigital.ula.ve

Asimismo, la metodología usada con técnicas electroquímicas demostró ser sencilla, rápida y lo más importante es que nos permitió separar las señales del analito de interés de sustancias interferentes, permitiéndole de esta forma estar un paso más adelante que otras metodologías si se llegase a aplicar como análisis de uso diario en los laboratorios del país.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRAFICAS

Abner Gilbert, G. (1907). A text book on uric acid and its congeners. Connecticut, U. S. A: The Dan Bury Medical printing company.

Alcaíno, H., Greig, D., Castro, P., Verdejo, H., Mellado, R., García, L., Díaz A., G., Quiroga, C., Chiong, M. (2011). Ácido úrico: una molécula con acciones paradójicas en la insuficiencia cardiaca. Revisión Médica Chile. Vol. (139); Pp: 505-515.

Alegret S., Del Valle, M., Merkoçi, A. (2004). Sensores electroquímicos. Bellaterra: Universidad Autónoma de Barcelona.

Álvarez Prats, M., Mantilla, M. E. (2013). El ácido úrico y su capacidad de ser o no un factor de riesgo de enfermedad vascular. Revista Cubana de Angiología y Cirugía Vascular. Vol. (14).

Atkins, Peter y de Paula, Julio. (2008). Química Física. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana.

Baeza R., Alejandro y García M., Arturo. (2011). Principios de electroquímica analítica. Colección de documentos de apoyo. UNAM.

Calvo, M., Robinson, D., Calvo, E. (1991). Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. España: Editorial Activos.

Cheng, Hongying, Liang, Jiantang, Zhang, Qianli y Tu, Yifeng. (2012). The electrochemical behavior and oxidation mechanism of sertraline on a rutin

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

modified electrode. Journal of Electroanalytical Chemistry. Vol. (674). Pp: 7 – 11.

Clavijo D., A. (2002). Fundamentos de química analítica. Equilibrio iónico y análisis químico. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

Consejo Superior de Investigaciones Cientificas (CSIC) y Centro para el Desarrollo tecnológico Industrial (CDTI). (1987). Introducción a los sensores. Madrid: Editorial ALCALA DE HENARES ARTES GRAFICAS, S.A.

Contento S., Ana M. (1997). Nuevos métodos fotométricos y cromatográficos para la determinación de colorantes rojos en alimentos. España. Editorial Universidad de Castilla – La Mancha.

www.bdigital.ula.ve

Da Silva, Luiz F., Ramos S., Nelson y Oliveira, Herenilton. (2008). Determination of Caffeic Acid in Red Wine by Voltammetric Method. Electroanalysis Vol. (20). Pp: 1252 – 1258

Deng Pan, Shengzhong Rong, Guangteng Zhang, Yannan Zhang, Qiang Zhou, Fenghai Liu, Miaojing Li, Dong Chang, Hongzhi Pan. (2015). Electrochemical Determination of Uric Acid at CdTe Quantum Dot Modified Glassy Carbon Electrodes. Journal of AOAC International Vol. (98). Pp: 1260 – 1266.

Díaz del Castillo R. (2012). Introducción a los nanomateriales (Maestria). Facultad de estudios superiores Cuautitlán Izcalli. México Recuperado de: http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/pagina_ingenieria/mecanica/mat/mat_mec/m6/Introduccion%20a%20los%20nanomateriales.pdf

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Dos Santos, Sidney X., Mazo, Luiz H. y Cavalheiro, Éder T. G.. (2008). The Use of a Graphite-Silicone Rubber Composite Electrode in the Determination of Rutin in Pharmaceutical Formulation. Chemical Society, (Vol) 19; Pp: 1600 – 1606.

Fundación Wikimedia, Inc. (2014). Wikipedia Licencia Creative Commons. Recuperado de https://es.wikipedia.org/wiki/Rutina_(flavonoide)

George Thomas, F. y Henze, G. (2001). Introduction to voltammetric analysis. Theory and practice. Australia: Editorial Csino publishing.

Gregory III, Jesse F. (2000). Vitaminas. Química de los alimentos. España: Editorial ACRIBIA.

Ghica, Mariana E. y Oliveira B., Ana Maria. (2004). Electrochemical Oxidation of Rutin. Electroanalysis. (Vol) 17; Pp: 313 – 318.

Gomella, L., Haist, S. (2007). Laboratory Diagnosis, chemistry, immunology, serology. New York: Editorial McGraw-Hill.

Guangzhi Hu, Yonggen Ma, Yong Guoa y Shijun Shao. (2008). Electrocatalytic oxidation and simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid on the gold nanoparticles-modified glassy carbon electrode. Electrochimica Acta. Vol. (53); Pp: 6610-6615.

GuiaLab. (2011). Guía de Productos para laboratorios analíticos. Recuperado de: http://www.guialab.com.ar/imprimir_art.php

Guo S, Wang E. (2007). Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. Analytica Chimica Acta. Vol. (598). Pp: 181-334.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Hurtado de Barrera, J. (2010). Guía para la comprensión holística de la ciencia. Venezuela: Editorial Fundación Sypal.

International conference on harmonization topic Q 2 (R1). (1995). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Reino Unido: European Medicines Agency.

Jian-Bo He, Guan-Ping Jin, Qun-Zhi Chen, Yan Wang (2007). A quercetin-modified biosensor for amperometric determination of uric acid in the present of ascorbic acid. Science Direct. Vol. (585). Pp: 337 – 343.

Jian-Bo He, Yan Wang, Ning Deng y Xiang-Qin Lin. (2007). Study of the adsorption and oxidation of antioxidant rutin by cyclic voltammetry–voltabsorptometry. Bioelectrochemistry (Vol) 71. Pp: 157 – 163.

www.bdigital.ula.ve

Jing An, Ying-YanBi, Chun-XiaYang, Fang-DiHua y Chun-MingWang. (2013) Electrochemical study and application on rutin at chitosan/graphene films modified glassy carbon electrode. Journal of Pharmaceutical Analysis (Vol) 2; Pp: 102 – 108.

Kondinski, Aleksandar. (2010). Picture of solution containing gold nanoparticles. Recuperado de: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gold255.jpg

Liang Wang, Pengfei Huang, Junyue Bai, Hongjing Wang, Xiaowei Wu, Yuqing Zhao. (2006). Voltammetric Sensing of Uric Acid and Ascorbic Acid with Poly (p-toluene sulfonic acid) Modified Electrode. International Journal Electrochemical Science. Vol. (1). Pp: 334-342.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Luna C., Carlos, Castañeda R., Diana, Rosas T., Rafael A., Sánchez J., Blanca. (2013). Fenómenos físicos de las nanopartículas. México: Editorial CELERINET.

Mannini, Matteo. (2008). Molecular Magnetic Materials on solid surfaces. Italia: Editorial Firenze University Press.

Mateo, D., Morales, P., Ávalos, A., Haza, A., (2013). Nanopartículas de oro: aplicaciones y citotoxicidad in vitro. Acta Toxicológica Argentina. Vol. (21). Pp: 102 -109.

Mauludin, R. y Müller R, K. (2009). "Kinetic solubility and dissolution velocity of rutin nanocrystals". European Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. (36). Pp: 502-510.

www.bdigital.ula.ve

Meenakshi, S. y Pandian, K. (2016) Simultaneous Voltammetry Detection of Dopamine and Uric Acid in Pharmaceutical Products and Urine Samples Using Ferrocene Carboxylic Acid Primed Nanoclay Modified Glassy Carbon Electrode. Journal of The Electrochemical Society. Vol. (163). Pp: B543 – B555.

Menéndez D., Faustino. (2008). Higiene industrial. Manual para la formación del especialista. España. Editorial Lex Nova S.A.

Menolasina, Sabino (2004). Fundamentos y aplicaciones de Electroquímica. Mérida, Venezuela: Fundacite.

Menolasina, S., De Santis, A. y Contreras, R. R. (2009). Comportamiento electroquímico de un electrodo de oro modificado con una monocapa

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

autoensamblada del ácido 2-N-bencil-1- ciclopenten-di-tiocarboxílico. Avances en Química. Vol. (4). Pp: 13 – 24.

Miller, James y Miller, Jane. (2002). Estadística y Quimiometría para química analítica. España. Editorial Prentice Hall

Miratul Khasanah, Muji Harsini, y Alfa Akustia Widati. (2013). Imprinting zeolite-modified glassy carbon as a voltammetric sensor for uric acid. Indonesia Journal Chemical. Vol. (13). Pp: 108 – 113.

Randviir, Edward P., Brownson, Jonathan P., Kadara, Rashid O. y Craig E. Banks. (2014). The fabrication, characterization and electrochemical investigation of screen-printed graphene electrodes. Physical Chemistry Chemical Physics. Vol. (16). Pp: 598-611.

www.bdigital.ula.ve

Reynolds, Martindale. (1996). The extra Pharmacopoeia. London: Editorial The Royal Pharmaceutical Society.

Ríos, C., María, A. y Rojas, L. (2012). Conjugación y caracterización de nanopartículas unidas a su superficie con proteína A. XVIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. México.

Rogríguez L., Saddys M. (2007). Obtención de nanopartículas y nanoordenamientos metálicos empleando la química de los compuestos de inclusión. Tesis doctoral. Universidad de Chile.

Rozo U., Ricardo y Gutíerrez D., Juan M. (2003). Prácticas y Procedimientos: guías de práctica clínica. Colombia: Editorial Medicas Latinoamericanas S.A.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Pei Kang Shen, Chao- Yang Wang, San Ping Jiang. (2016). Electrochemical energy. Boca Rato: Editorial Taylor and Francis Group.

Syed M, Usman A, Zaffar H, Mahammad K, Uda H & Magnus W. (2012). A Potentiometrid Indirect Uric Acid Sensor Based on ZnO Nanoflakes and Immobilized Uricase. Sensors. Vol. (12). Pp: 2787 – 2797.

Teixeira, C., Siquet, C., Alves, I., Boal, M.P., Marques, F., Borges, J., Lima, S. (2005). Structure–property studies on the antioxidant activity of flavonoids present in diet. Free Radical Biology and medicine. Vol. (39). Pp: 1099 - 1108.

Uslu, B. y Ozkan, Z. (2007). Solid Electrodes in electroanalytical chemistry: present applications and prospect for high throughput screening of drug compounds. Vol. (10). Pp: 495 - 510.

www.bdigital.ula.ve

Villarreal, D., Enrique y Bello, Silvia. (1975). Electroquímica. México: Editorial Programa Nacional de Formación de Profesores, Asociación Nacional de Universidades e Institutos de Enseñanza Superior.

Wessling, Bernhard. (1999). Conductive Polymer / Solvent Systems: Solutions or Dispersions. Debate of Handbook of nanostructured materials and nanotechnology. Vol. (5). Pp: 525 - 553.

Williamson, MA., Synder LM, Wallach JB., Wallach's. (2011). Interpretation of diagnostic tests. Philadelphia, PA: Editorial Wolters Kluwer Health.

Zhang Jian Zhixin Zhu, Jianling Zhu, Kechang Li y Shucheng Hua. (2014). Selective Determination of Dopamine, Ascorbic Acid and Uric Acid at SDS-

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

MWCNTs Modified Glassy Carbon Electrode. International Journal Electrochemical Science, Vol. (9). Pp: 1264 – 1272.

Zhu yan, Jian-Rong Zhang, y Hui-Qun Fang. (1999). Electrocatalytic oxidation of uric acid at cysteine modified glassy carbon electrode. Analitical Letters. Vol. (32). Pp: 223 - 234.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)