



Universidad de Oviedo

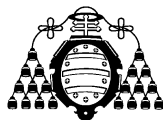
MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

**Sistema electroanalítico miniaturizado para análisis por
inyección en un sistema estático basado en alfileres de
acero inoxidable**

Alejandro García-Miranda Ferrari

Julio 2016, Oviedo



MARÍA TERESA FERNÁNDEZ ABEDUL, Profesora del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado “SISTEMA ELECTROANALÍTICO MINIATURIZADO PARA ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN UN SISTEMA ESTÁTICO BASADO EN ALFILERES DE ACERO INOXIDABLE”

ha sido realizado por el alumno ALEJANDRO GARCÍA-MIRANDA FERRARI bajo mi dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2015-16, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 14 de JULIO de 2016

Fdo: M.Teresa Fernández Abedul

Agradecimientos:

Deseo expresar mi agradecimiento:

A Maria Teresa Fernández Abedul, Dra. del Departamento de Química Física y Analítica, por darme la oportunidad de realizar este Trabajo de Fin de Máster bajo su dirección y mostrarme un camino con su entusiasmo y ganas de cada día.

A todos los compañeros del laboratorio del grupo de investigación, Estefanía y Olaya especialmente, por haberme acogido y ayudado en todo momento.

A mi familia y amigos, y en especial a mi padre y mi hermano, por haberme ayudado a buscar y encontrar soluciones o posibilidades aunque sus conocimientos en la materia no fueran muy extensos.

ÍNDICE

1.- Introducción.....	1
1.1 Tendencias actuales Química Analítica.....	1
1.2 Electroanálisis.....	2
1.3 Sistemas electroanalíticos miniaturizados	5
1.4 Sistemas de análisis por inyección	8
1.5 Técnicas electroquímicas.....	11
1.6 Epinefrina	14
2. Objetivo del trabajo.....	15
3. Experimental	16
3.1 Instrumentación y aparatos.....	16
3.2 Reactivos y disoluciones	17
3.3 Procedimientos.....	18
3.3.1 Preparación del transductor	18
3.3.2 Medidas electroquímicas	19
4. Resultados y discusión.....	20
4.1 Diseño de la celda.....	20
4.2 Señal analítica	22
4.2.1 Selección de disolución tampón	22
4.3 Optimizaciones.....	25
4.3.1 Agitación.....	26
4.3.2 Evaporación.....	27
4.3.3 Inyección.....	28
4.3.4 Potencial de detección	31
4.4 Volumen de disolución reguladora.....	33
4.5 Características de la metodología analítica	35
4.5.1 Curva de calibrado	36
4.5.2 Precisión	37
4.6 MultidetECCIÓN	41
4.6.1 Diseño de la celda	41
4.6.2 Precisión de la celda.....	43
5. Conclusiones y perspectivas de futuro	45
6. Bibliografía.....	47

1.- Introducción

1.1 Tendencias actuales Química Analítica

El principal objetivo de la Química Analítica hoy en día es la optimización de los procesos analíticos, tanto en dificultad como en coste o tiempo. Gracias a la tecnología e instrumentación desarrollada en las últimas décadas, la Química Analítica centra sus esfuerzos en 3 pilares principales:

- Automatización: reducción de la intervención humana.
- Miniaturización: reducción de dimensiones.
- Simplificación: reducción de dificultad y/o procesos.

Estas tendencias no son independientes (Figura 1), sino que están interrelacionadas. Así si se pretende simplificar un sistema, es conveniente hacer más sencillo su manejo, su construcción y su mantenimiento, de manera que las ventajas vienen dadas tanto por un menor volumen de reactivos y muestras, mayor rapidez en el análisis, e incluso posibilidad de realizar análisis automatizados o en serie de manera sencilla de forma que se minimicen errores humanos. Además, añadir que todo ello conlleva una reducción de costes, lo cual lo convierte en una importante tendencia en los últimos tiempos.



Figura 1: Interrelación entre algunas de las principales tendencias en la Química Analítica.

Estas bases tienen como objetivo tanto la evolución de los sistemas ya existentes, así como abordar nuevos problemas analíticos que puedan surgir en el futuro.

1.2 Electroanálisis

Las técnicas electroquímicas se basan en la interacción de la química con la electricidad, es decir, mediciones de magnitudes eléctricas tales como corriente, potencial o carga, y su relación con los parámetros químicos (Wang, Analytical Electrochemistry, 2000).

Dicha aplicación de magnitudes eléctricas para fines analíticos tiene un enorme rango de aplicaciones, desde monitorización de agentes ambientales a controles de calidad en la industria o análisis clínico, forense o agroalimentario. Hay dos campos en los que la electroquímica ha sufrido un gran desarrollo: el campo de la energía y el análisis. En la década de los 70 gracias a los avances en la informática, se obtuvo una mayor simplificación en el manejo de los instrumentos, así como su automatización. (Wang, Analytical Electrochemistry, 2000)

En esa época, de manera general, los equipos y técnicas analíticas necesitaban de material muy especializado así como de personal muy formado, con instalaciones centralizadas y elaboradas.

En la actualidad existe una demanda creciente en el desarrollo de dispositivos analíticos portátiles, sobre todo para el análisis medioambiental, clínico o de muestras agroalimentarias (Wang, Portable electrochemical systems, 2002). En el área del diagnóstico clínico, se conocen como dispositivos Point-of-Care o POC, que permiten la descentralización de los laboratorios, llevando a cabo las medidas en cualquier lugar o tiempo. (Gubala, Harris, Ricco, Tan, & Williams, 2011)

La miniaturización y automatización conseguidas en épocas recientes permite la realización de diagnósticos rápidos, *in situ*, y una actuación correctora tras la realización de los mismos. Gracias a ello se consigue una respuesta mucho más rápida, evitando así posibles pérdidas en el caso de análisis industriales, o en el caso de la sanidad nos permite la detección de enfermedades o trastornos en un menor periodo de tiempo, repercutiendo en un tratamiento temprano, con el consiguiente ahorro en tratamientos crónicos, así como en la calidad de vida del paciente. Un claro ejemplo de ello es el sensor de glucosa para diabéticos, que permite al propio paciente hacer un seguimiento de su enfermedad sin necesidad de conocimientos, con un equipo barato, portátil, y de fácil manejo tal como se muestra en la Figura 2.



Figura 2: Ejemplo de sensor de glucosa portátil.

La propia idea de este sensor de glucosa puede ser trasladada al diagnóstico de otras patologías de manera que, junto con el uso de biomarcadores, herramientas electroquímicas y/o nanotecnológicas puedan ayudar a dar un paso más en el diagnóstico y tratamiento de multitud de enfermedades.

Respecto a las técnicas de detección, existen multitud de principios en los que podemos basar la detección, pudiendo basarse en propiedades electroquímicas, ópticas, piezoeléctricas o térmicas, donde a su vez, cada uno de ellos, puede medir propiedades diferentes como refleja la Tabla 1. (Jiang, Pang, Shen, Yu, & Zhang, 2009) (Lambert, Milkani, & Morais, 2010) (Tohill & Uludag, 2010) (Bhand, Danielsson, & Yakovleva, 2013)

Tabla 1: Comparativa de los diferentes modos de transducción.

Principio	Transducción	Señal analítica
Electroquímicos	Amperometría	Intensidad de Corriente
	Conductimetría	Conductividad
	Medida de impedancia	Impedancia
	Potenciometría	Potencial
Ópticos	Luminiscencia	Intensidad de emisión de fosforescencia, fluorescencia, quimioluminiscencia, electroquimioluminiscencia o intensidad de absorción
	SPR (Resonancia de Plasmón Superficial)	Índice refracción
Piezoeléctricos	Microbalanza de Cuarzo	Frecuencia de resonancia
Térmicos	Termistor	Conductividad térmica

En este trabajo nos vamos a centrar en las técnicas electroquímicas, que gozan de múltiples ventajas como una gran selectividad y sensibilidad, así como rapidez, bajo coste y sencillez (Martin, Pasas, & W.R., 2002).

Desde sus inicios, la electroquímica ha avanzado conforme al desarrollo de herramientas de trabajo, y así, se han empleado electrodos de algún tipo de metal como zinc o platino, pasando por los electrodos de gota colgante de mercurio, hasta los electrodos de carbono en las últimas décadas como los que se muestran en la Figura 3.

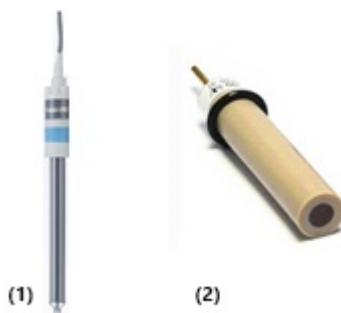


Figura 3: Electrodo de metal típico (1) y electrodo de carbono vítreo o glassy carbon (2).

Este tipo de electrodos, así como otros electrodos sólidos considerados ya convencionales han sido ampliamente usados y estudiados, pero debido a que necesitan una celda de elevado volumen y tienen un gran coste, la propia tendencia de miniaturización se ha abierto camino con los llamados electrodos serigrafados, de capa gruesa o "thick-film" al igual que los de capa fina o "thin-film" como se muestra en la Figura 4.

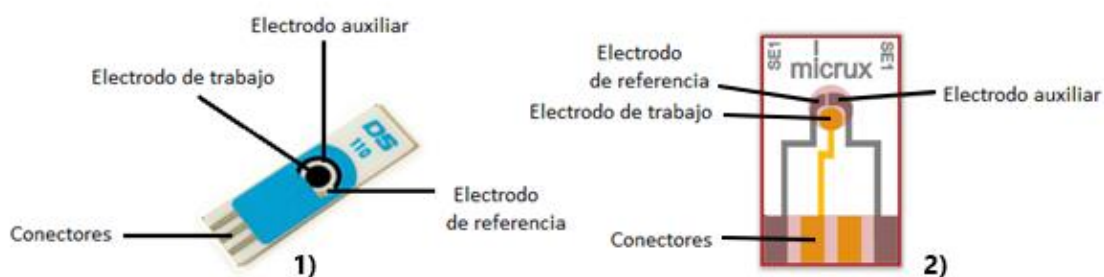


Figura 4: Ejemplos de electrodo de capa gruesa (1) (Dropsens, 2016) y capa fina (2) (Micrux, 2016).

1.3 Sistemas electroanalíticos miniaturizados

Los electrodos serigrafiados son uno de los mejores ejemplos de sistemas miniaturizados, ya que poseen un tamaño de apenas unos centímetros, son ligeros y se manejan y transportan fácilmente, necesitando apenas una gota de disolución, permitiendo así la realización de análisis *in situ* (Wang & Tian, Screen-printed electrodes for stripping measurements of trace mercury., 1992).

Por otro lado es posible su modificación superficial mediante moléculas biológicas (Albareda-Sirvent, Merkoçi, & Alegret, 2000) como anticuerpos, proteínas o incluso con nanomateriales (Domínguez Renedo, Alonso-Lomillo, & Arcos Martínez, 2007), de manera que son una herramienta muy versátil, fácilmente adaptable a ámbitos como el medioambiental para la determinación de contaminantes o pesticidas (Gan, Yang, Xie, Wu, & Wen, 2010), el alimentario (Biscay, Costa Rama, García, Carrazón, & Costa-García, 2011) o el análisis clínico para determinar biomarcadores como, por ejemplo, de la enfermedad celíaca (Neves, González-García, a Nouws, & Costa-García, 2012). Todo ello hace que en la actualidad los electrodos serigrafiados hayan desplazado a los electrodos clásicos de carbono (pasta de carbono o carbono vítreo).

Con la reducción en el tamaño de los dispositivos y el empleo de volúmenes de muestra muy bajos es necesaria una detección sensible, que depende de factores como las dimensiones de la interfase electrodo-disolución o la propia naturaleza del analito, por tanto, dicha detección es igualmente posible en sistemas miniaturizados.

Dentro de la miniaturización de los sistemas electroanalíticos, en la actualidad ha surgido un gran interés por el uso de materiales comunes de bajo coste y desechables para la fabricación de electrodos. En el caso de las técnicas electroquímicas resulta especialmente interesante su aplicación para el desarrollo de dispositivos sencillos y de pequeño tamaño que puedan ser portátiles, requieran bajo consumo de muestra y además posean buena precisión.

Recientemente, en un trabajo realizado en colaboración con el grupo del Profesor Whitesides de la Universidad de Harvard (Glavan, Ainla, Hamedi, Fernández-Abedul, & Whitesides, 2016), se estudia el uso de alfileres de acero inoxidable como electrodos (Figura 5). Su uso ofrece una gran versatilidad en cuanto a la disposición de los electrodos gracias a su pequeño tamaño, ofreciendo múltiples posibilidades en el diseño de dispositivos.

Los alfileres son un material de fácil acceso en todo el mundo, son altamente conductores y electroquímicamente estables en medios acuosos neutros o ligeramente ácidos o básicos (Kaneko & Isaacs, 2000). Además, pueden modificarse con tinta conductora de carbono para su uso como electrodos de trabajo.

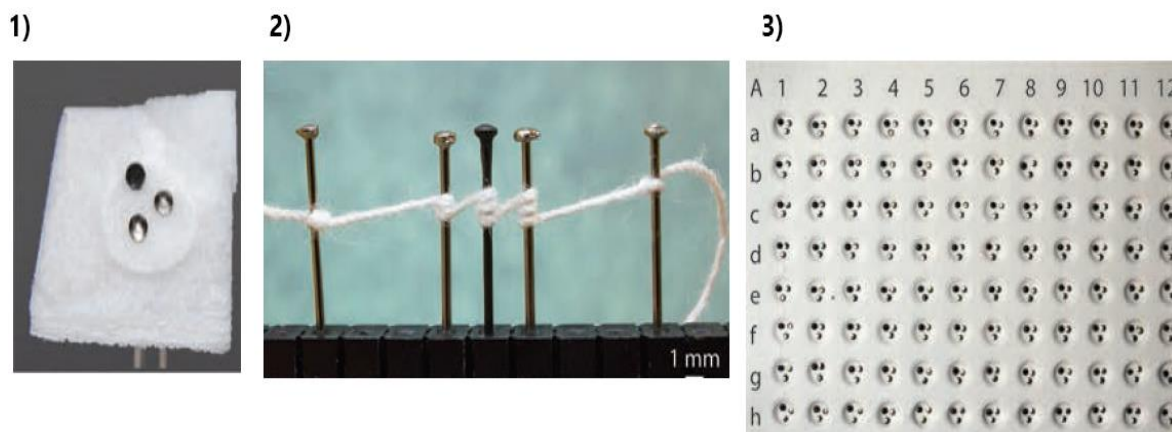


Figura 5: Uso de alfileres de acero inoxidable. Diferentes disposiciones de las celdas electroquímicas: tres alfileres a modo de electrodos de referencia, trabajo y auxiliar sobre papel omnifóbico (1), alfileres en línea conectados mediante un hilo de algodón (2), placa de papel omnifóbico con 96 celdas electroquímicas formadas por tres alfileres cada una (3). (Glavan, Ainla, Hamedi, Fernández-Abedul, & Whitesides, 2016).

Cabe destacar la importancia que supone el uso de materiales de bajo coste y comunes en el día a día, ya que nos ofrecen aplicaciones muy variadas. Por lo que respecta a su uso en países desarrollados, éste puede suponer la descentralización de los análisis, como ha sucedido con el sensor de glucosa portátil así como, gracias a internet y al llamado "Big Data", puede facilitar e incrementar el acceso a la información de ciertos marcadores de diagnóstico como el nivel de colesterol en sangre, hormonas tiroideas u otros de la población en general para estudios epidemiológicos, sociológicos etc.

Por otro lado, son también interesantes las opciones que este tipo de materiales puede ofrecer en países en desarrollo, donde el acceso a la electricidad y a la sanidad es difícil, de manera que el uso de dispositivos electroanalíticos portátiles de bajo coste podrían permitir la detección precoz o el seguimiento de multitud de enfermedades de manera inmediata, *in situ*, sin personal especializado.

Una de las iniciativas que trata de acercar y facilitar la disponibilidad de dispositivos de diagnóstico es la base de la organización sin ánimo de lucro "diagnostics for all" cuyos

proyectos se centran en la erradicación de enfermedades como el tétanos o sarampión, la malnutrición infantil, la detección de enfermedades infecciosas mediante ácidos nucleicos o dispositivos de diagnóstico basados en papel para la detección de marcadores hepáticos con una gota de sangre. (Diagnostics for All, 2016)



Figura 6: Ejemplo representativo de análisis descentralizado en países en desarrollo de la iniciativa "Diagnostics for All" (Diagnostics for All, 2016).

1.4 Sistemas de análisis por inyección

Dentro de las tendencias comentadas, la automatización de las metodologías ha llevado al desarrollo de los métodos de análisis automático continuo. Un ejemplo es el llamado FIA (Flow Injection Analysis) o análisis por inyección en flujo, que permite una alta frecuencia de análisis y se basa en la inyección de la muestra en una corriente fluida de manera continua para su posterior detección al llegar al detector.

Los sistemas FIA, desarrollados por Ruzicka y Hansen en la década de los 70, son capaces de conseguir la detección sin intervención alguna de un operador gracias a la corriente del líquido. Permiten analizar gran cantidad de muestra en un corto espacio de tiempo con un mínimo trabajo, disminuyendo el coste de cada ensayo individual, aportando además precisión (Ruzicka & Hansen, 1975) (Trojanowicz & Kołacińska, 2016) (Escarpa, M.C., & López, 2015).

Un sistema FIA consta, de manera sencilla, de los siguientes elementos tal y como se muestra en la Figura 7: un reservorio con reactivo o disolución portadora, una unidad propulsora que arrastre de dicho reactivo, un sistema de inyección de la muestra, una zona de mezclado entre la muestra y el reactivo para que tenga lugar la reacción deseada y por último un detector.

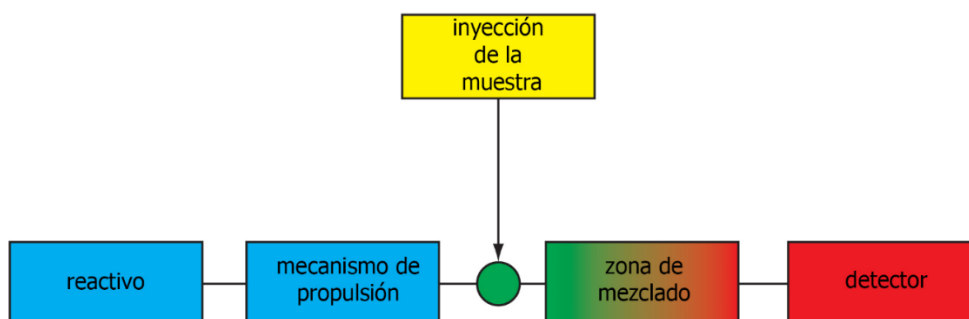


Figura 7: Elementos básicos que conforman un sistema de inyección en flujo o FIA.

El mezclado del reactivo con la muestra provoca una reacción química que dará lugar a un producto, el cual será detectado en el detector gracias al empuje provocado por el sistema de propulsión, todo ello de manera automatizada. En el sistema FIA más sencillo no sucede una reacción, sino que simplemente la muestra se inyecta en una corriente portadora que la "presenta" al detector.

La detección electroquímica, especialmente la amperométrica, ha sido gran número de veces acoplada a sistemas FIA, tanto en sistemas de 3 electrodos (electrodo de trabajo de pasta de carbono), con electrodos serigrafiados, o incluso en sistemas miniaturizados de bajo coste ofreciendo en sus fiagramas, picos muy definidos con una rápida ascensión y vuelta a la línea de base, reflejando la velocidad con la que el analito pasa por la superficie del electrodo de trabajo (Costa Rama, Costa-García, & Fernández-Abedul, 2016).

A pesar de su gran desarrollo y versatilidad, una de las mayores desventajas de estos sistemas FIA clásicos es el alto consumo de reactivos y analitos, así como un continuo desgaste del equipo de medición.

Otro sistema de análisis por inyección es el sistema BIA (Batch Injection Analysis), que podríamos llamar en castellano análisis por inyección en un sistema estático, basado en la inyección de una alícuota de pequeño volumen de muestra directamente sobre la superficie del electrodo, todo ello inmerso en una disolución reguladora en la celda electroquímica.

La muestra se inyecta directamente sobre el electrodo de trabajo del sistema potencioestático de 3 electrodos, de modo que el transporte del analito a la superficie del electrodo es rápido que se diluye posteriormente en la disolución circundante, dando lugar a una señal transitoria. Suele estar acoplada a pipetas motorizadas o electrónicas, para obtener un transporte reproducible, con una dispersión controlada en tiempo y espacio. Al igual que en sistemas FIA, en BIA se obtienen picos definidos, que crecen y decrecen rápidamente (Wang & Taha, Batch injection with potentiometric detection , 1991) (Brett & Fungaro, 1999).

En la Figura 8 se observa un ejemplo de sistema BIA con un electrodo de trabajo de pasta de carbono, electrodos de referencia y auxiliar y agitador. (Escarpa, M.C., & López, 2015)

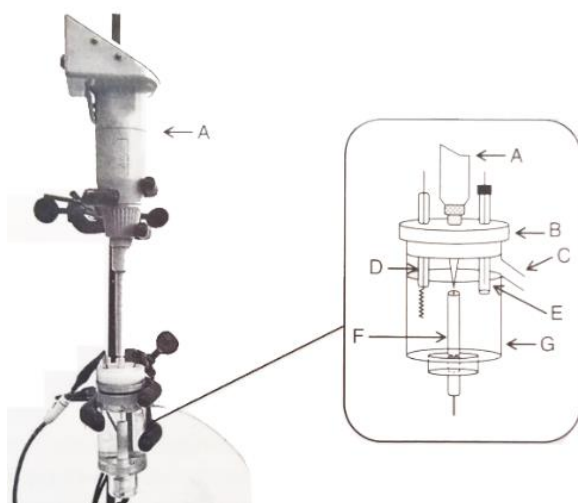


Figura 8: Diagrama esquemático de celda BIA con detección amperométrica. A) Pipeta Electrónica; B) Tapa de la celda; C) Drenaje; D) Electrodo auxiliar; E) Electrodo de referencia; F) Electrodo de trabajo; G) Celda. (Cárdenas & Valcárcel, 2000)

La amperometría consiste en medir la intensidad de corriente resultante en un proceso de oxidación o reducción. Dicho proceso electroquímico tiene lugar sobre la superficie del electrodo al aplicar un potencial constante entre dicho electrodo (de trabajo) y otro electrodo de referencia.

La principal ventaja del BIA es la rapidez, sensibilidad y baja necesidad de volumen de muestra al igual que en el FIA, pero el BIA no necesita sistemas de propulsión del líquido, válvulas u otros componentes, lo que hace que sea un sistema muy sencillo, prácticamente "equipment-free" a excepción del potencióstato. (Wang & Taha, Batch injection with potentiometric detection , 1991)

La técnica empleada en sistemas de análisis por inyección en estático, por sus características intrínsecas es la amperometría, que nos permite diferenciar sustancias electroactivas de sustancias no electroactivas, y dentro de las electroactivas nos permite diferenciar entre ellas en función del potencial que apliquemos (Wang & Taha, Batch injection analysis , 1991).

Inicialmente el BIA, dado al gran espacio que ocupaban los electrodos tradicionales, se asoció con celdas de gran volumen (1L) que permitiera la dilución de la muestra inyectada. Celdas BIA de menor tamaño junto con electrodos tradicionales han sido empleadas para la determinación de diversos analitos en mezclas complejas, como es el caso de la determinación de etanol en gasohol o combustible basados en etanol (Fernandez Pereira, y otros, 2013) determinación de ciertos analitos en formulaciones farmacéuticas (Stefano, de Lima, Montes, Richter, & Muñoz, 2012) (Quintino, Corbo, Bertotti, & Angnes, 2002) (Quintino, Araki, Toma, & Angnes, 2002) o la cuantificación del consumo del radical DPPH para evaluar la capacidad antioxidante de una mezcla (Oliveira, y otros, 2016)

Como última tendencia hay varias publicaciones que incorporan los electrodos serigrafiados en celdas BIA (Figura 9), lo cual supone la generación de un sistema electroanalítico portátil, pudiendo incluso acoplarlo a otros componentes portátiles tales como pipeta, mini-potenciostatos y ordenadores para poder así operar fuera del laboratorio, sin necesidad de una fuente de energía externa.

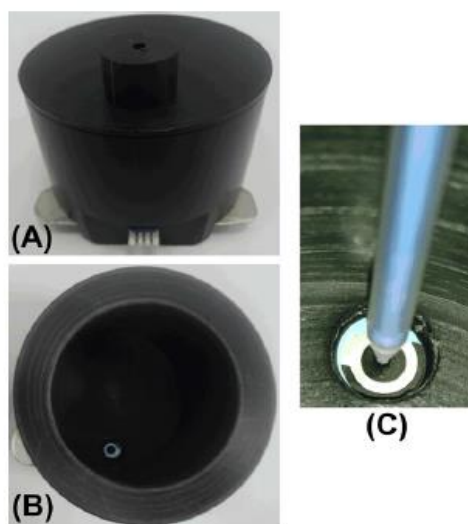


Figura 9: Ejemplo de celda BIA acoplada a electrodo serigrafiado desde vista frontal (A), superior (B) y detalle del electrodo en el fondo de la celda (C) (Tormin, Rodrigues Cunha, Bezerra da Silva, Abarza Munoz, & Richter, 2014).

Este acoplamiento de electrodos serigrafiados a un sistema de análisis por inyección en un sistema estático permite beneficiarse de las ventajas de los electrodos serigrafiados, como su simplicidad, pequeño tamaño y carácter desechable gracias a su bajo coste. Pese a no haber muchas publicaciones de este tipo, hay algunas que recogen la determinación de ciertos analitos en fármacos (Tormin, Cunha, da Silva, Muñoz, & Richter, 2014) (Stefano, Cordeiro, Marra, Richter, & Muñoz, 2016)

1.5 Técnicas electroquímicas

Los parámetros más relevantes en un voltamperograma cíclico (curva i - E) son el potencial y la intensidad de pico de oxidación o reducción. En nuestro caso se realizan voltamperogramas cíclicos para seleccionar el potencial a usar en las correspondientes amperometrías.

La voltamperometría cíclica consiste en la variación de un potencial de manera cíclica en una rampa lineal en función del tiempo, todo ello para medir la corriente resultante tal y como se muestra en la Figura 10. Se aplica el potencial entre el electrodo de trabajo y el de referencia, mientras que se mide la corriente entre el electrodo de trabajo y el auxiliar.

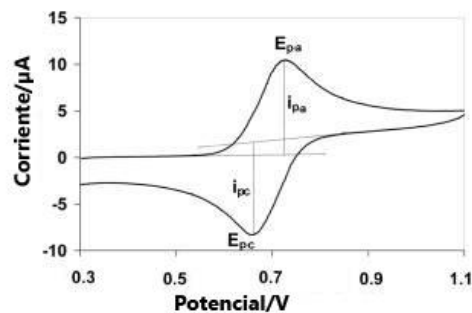


Figura 10: Voltamperograma cíclico: E_{pc}) potencial catódico; i_{pc}) intensidad de pico catódico; E_{pa}) potencial anódico; i_{pa}) intensidad de pico anódico.

Los parámetros más importantes para el análisis del proceso electroquímico (además de los potenciales de pico) con esta técnica son las corrientes o intensidades de pico anódico (i_{pa}) y catódico (i_{pc}) respectivamente, ya que son proporcionales a la concentración de la especie analizada.

En amperometría, donde se registra la corriente generada tras la aplicación de un potencial constante (curva $i-t$), la señal analítica es la intensidad de corriente medida a un tiempo fijo, la cual es proporcional a la concentración de la especie.

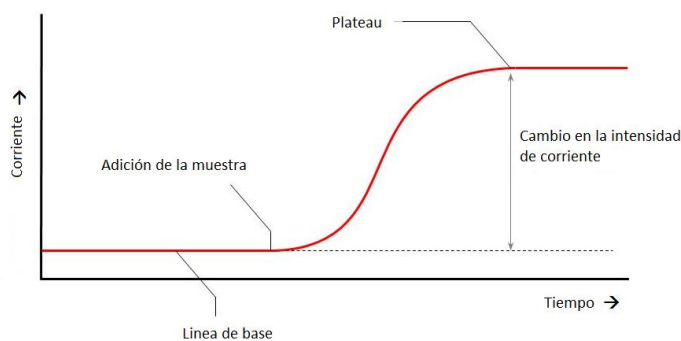


Figura 11: Esquema del registro obtenido amperométricamente al añadir una disolución de una molécula electroactiva.

En la Figura 11 se muestra una amperometría típica, en la que se parte de una corriente inicial en ausencia de analito, la llamada línea de base. Tras añadir la molécula electroactiva, ésta se oxida o reduce dependiendo de si el potencial es positivo o negativo respectivamente, hasta alcanzar una cierta intensidad a un tiempo fijo, es el llamado "plateau". Esta meseta se alcanza porque la velocidad de aporte de analito iguala a la velocidad de transferencia electrónica. Si no hay aporte de molécula electroactiva (p.ej. no hay agitación, en vez de meseta se obtiene una señal transitoria). La señal analítica, en este último caso, sería la altura del pico, que es

proporcional a la concentración de analito. Esta señal transitoria es la que se obtendría en un sistema de análisis por inyección en un sistema estático o en flujo, dado que no hay aporte continuo de muestra.

Mediante la amperometría vamos a cuantificar la concentración de epinefrina en nuestras disoluciones gracias a la relación proporcional entre la intensidad de corriente observada y la concentración del analito al inyectarlo sobre la superficie del electrodo. El cambio en la corriente observada se debe a la oxidación de la epinefrina (Figura 12) al aplicar un potencial constante.

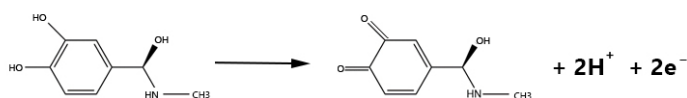


Figura 12: Proceso de oxidación de la epinefrina.

1.6 Epinefrina

En este estudio se ha escogido la epinefrina (Figura 13) como analito modelo. La epinefrina, también conocida como adrenalina, es un derivado bencénico con dos grupos hidroxilos y una cadena alquilamina. Es uno de los neurotransmisores más importantes debido a su rol en los mamíferos, ya que niveles elevados de epinefrina están asociados con estrés o deficiencias en hormonas tiroideas, mientras que sus niveles bajos están asociados a hipotensión (Xiaorong, Yuanxi, Bing, Fei, & Xingyao, 1997).

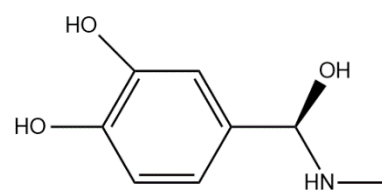


Figura 13: Estructura química de la epinefrina.

Por estas razones, la epinefrina es una molécula con amplio interés en condiciones de pH fisiológico, pero también en investigación farmacológica.

Gracias a la fácil oxidación de la epinefrina (Hawley, Tatawawadi, Piekarski, & Adams, 1967) (Du, Zou, & Wang, 2002), los métodos electroquímicos empleados en su determinación ofrecen la ventaja de ser rápidos, sensibles y de menor coste que los especificados anteriormente. Pese a ello, la epinefrina coexiste en la naturaleza con otras especies químicas que se oxidan a potenciales semejantes, tales como ácido úrico o ascórbico (Luczac, 2009) por lo que se suele emplear cromatografía líquida de alta resolución combinada con la detección electroquímica.

En la actualidad existen múltiples métodos para la determinación de epinefrina, desde cromatografía líquida de alta eficacia con detección UV/Vis (Mishra, Upadhyay, Patra, Chaudhury, & Chattopadhyay, 2009), análisis por inyección en flujo con detección electroquimioluminiscente (Deftereos, Calokerinos, & Efstathiou, 1993) o electroforesis capilar con detección UV/Vis (Wei, Song, & Lin, 2005), pero son métodos que requieren mucho tiempo a la vez que equipamiento costoso y unas condiciones experimentales muy controladas.

2. Objetivo del trabajo

En este trabajo se pretende desarrollar un método miniaturizado, de bajo coste acoplado a un sistema de análisis por inyección en estático (BIA) para la determinación de epinefrina. El sensor se prepara con alfileres de acero inoxidable, actuando como electrodo de trabajo la propia cabeza de dicho alfiler que es modificada con tinta de carbono. Éste se coloca junto con otros dos alfileres (no modificados) en el fondo de una celda de polipropileno que se rellena con una disolución reguladora quedando los electrodos sumergidos.

Para alcanzar este objetivo general, es necesario cumplir otros subobjetivos:

- Diseño de una celda BIA para detección electroquímica basada en el empleo de alfileres de acero inoxidable.
- Optimización de los diferentes parámetros del sistema de medida única.
- Adaptación de la celda de una sola medida a otra multimedida para empleo con pipeta multicanal.
- Desarrollo de una metodología analítica que permita su aplicación a diversos campos. En este caso, y como prueba de concepto se evalúa con disoluciones de epinefrina.

3. Experimental

3.1 Instrumentación y aparatos

En el desarrollo de este trabajo se ha hecho uso de un potenciostato μ AUTOLABIII/FRA2 con el software GEPS versión 4.9 para los experimentos de una celda electroquímica suministrado por Metrohm Autolab (Holanda). Para el desarrollo de la plataforma de 8 medidas simultáneas se ha usado un potenciostato μ Stat 8000 con el software Dropview 8400 versión 2,0 suministrado por Dropsens (España) como se muestran en la Figura 14.

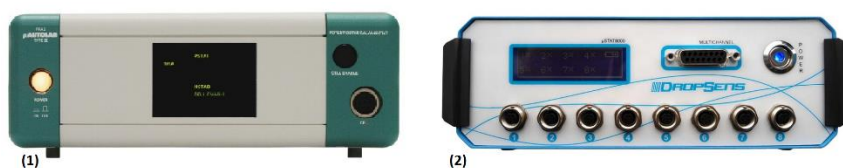


Figura 14: 1) Potenciostato μ AUTOLABIII/FRA2; 2) Potenciostato μ Stat 8000.

En ambos casos los potenciostatos fueron acoplados con sus correspondientes conectores así como a un ordenador Pentium 4 2,4 GHz del propio laboratorio del grupo de investigación.

Como electrodos se han empleado alfileres de acero inoxidable de 26 mm de longitud y 0,59 mm de diámetro suministrados por Folch (España).

Como equipos para la realización de diferentes tareas se han usado los siguientes equipos:

- pHmetro micro-pH 2011 suministrado por Crison (Alemania).
- Balanza analítica AB54 suministrada por Mettler Toledo (Suiza).
- Agitador Vortex Mixer F202A0175 suministrado por VELP Scientifica (Italia).
- Agitador MR2000 suministrado por Heidolph (España)
- Baño de ultrasonidos Elmasonic P suministrado por Elma (Alemania).
- Pipeta manual ES-100 Plus Pipette suministrada por Eppendorf Research (Alemania) y pipeta electrónica multicanal P3608L-200 suministrada por Labnet (USA) como las de la Figura 15.



Figura 15: Micropipetas de un canal (1) y de ocho canales (2).

3.2 Reactivos y disoluciones

Los reactivos empleados en el transcurso de este proyecto han sido:

- Epinefrina y el hidróxido sódico fueron suministrados por Sigma Aldrich (USA).
- Ácido sulfúrico 95-97%, sodio acetato trihidrato y ácido acético glacial 100% suministrados por Merck (España).
- Ácido clorhídrico fumante 37% suministrado por Scharlau (España).
- N,N-dimetilformamida (DMF, $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$) suministrado por Normapur (España).

Las disoluciones empleadas en el proyecto han sido:

- Disolución reguladora de fosfato salino (PBS) 0,01M de pH 7, preparada semanalmente a partir de NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 .
- Disolución de H_2SO_4 0,1M.
- Disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico 0,1 M y pH 5.
- Disoluciones de epinefrina preparadas a partir de una disolución madre 0,01 M disuelta en HCl 0,01 M. Las posteriores diluciones se llevaron a cabo en las respectivas disoluciones tampón.

Para la agitación se ha usado siempre una velocidad de 100rpm con el agitador Heidolph MR2000.

Todos los reactivos fueron usados sin purificación. Las disoluciones de epinefrina fueron preparadas diariamente, justo antes de llevar a cabo los experimentos, protegidas de la luz solar.

Para la modificación de las cabezas de los alfileres se ha empleado tinta de carbono suministrada por Gwent (Reino Unido).

Todas las disoluciones han sido realizadas con agua ultrapura obtenida gracias a un sistema Milli-Q (Merck) con filtro Progard 2.

3.3 Procedimientos

3.3.1 Preparación del transductor

Como ya se ha comentado, en este trabajo se utiliza un dispositivo electroanalítico a base de alfileres de acero inoxidable para el desarrollo de un sistema BIA de bajo coste.

A continuación se detalla el procedimiento para el desarrollo de dispositivos basados en alfileres de acero inoxidable a modo de electrodos, el cual ha sido previamente optimizado por el grupo de investigación en colaboración con el grupo del Profesor Whitesides (Glavan, Ainla, Hamedi, Fernández-Abedul, & Whitesides, 2016).

En primer lugar se prepara una suspensión de tinta de carbono en N,N-dimetilformamida (DMF), formada a partes iguales en peso. Dicha tinta suele hacerse en pequeñas cantidades cada vez, normalmente 1mL en total y se somete a ultrasonidos 1 hora y 37 kHz para que se homogeneice.

Para la limpieza de todos los electrodos se sumerge la cabeza de los alfileres en isopropanol y se somete a ultrasonidos durante 30 minutos y 37 kHz.

Para la fabricación de los electrodos de trabajo, se sumerge la cabeza de cada alfiler tres veces en la suspensión de la tinta de carbono, llevándolos a la estufa a 37 °C durante 15 minutos entre las dos primeras inmersiones, y 24 horas en la estufa tras la tercera. Después de todas las inmersiones los electrodos de trabajo tendrían un aspecto similar al de la Figura 16.



Figura 16: Electrodo de trabajo listo para su uso, formado por alfileres de acero inoxidable y tinta de carbono.

A la hora de realizar las medidas, se coloca la pipeta a unos 2 mm aproximados de la cabeza del alfiler que actúa como electrodo de trabajo y se inyecta la muestra directamente sobre la cabeza del electrodo de trabajo como se aprecia en la Figura 17.

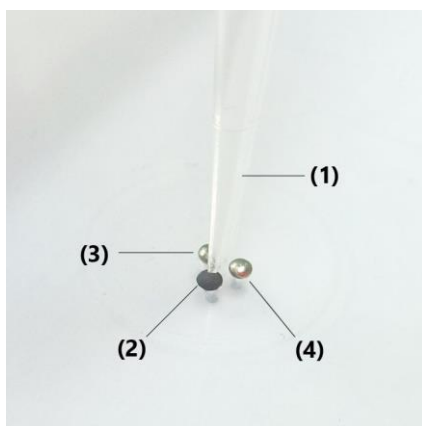


Figura 17: Punta de pipeta de 20 μL (1) electrodo de trabajo (2), auxiliar (3) y referencia (4).

3.3.2 Medidas electroquímicas

Todas las medidas electroquímicas fueron llevadas a temperatura ambiente del laboratorio.

Los voltamperogramas cíclicos fueron registrados realizando un barrido de potenciales entre -0,5 V y 1,0 V con una velocidad de barrido de 50 mV/s, en diferentes disoluciones reguladoras según el caso.

4. Resultados y discusión

4.1 Diseño de la celda

En este apartado se va a comentar el diseño propio realizado para alojar la celda electroquímica basada en alfileres, que permita la detección de epinefrina. Como se va a inyectar un volumen de analito sobre la cabeza del alfiler que actúa como electrodo de trabajo, es importante que la relación volumen del depósito/volumen inyectado sea lo más elevada posible. De esta manera la difusión de la sustancia hacia la disolución, una vez que ésta llega a la superficie electródica estará más favorecida y la anchura del pico será menor, lo que permite una mayor frecuencia de muestreo (número de muestras inyectadas por unidad de tiempo).

En este caso, vamos a emplear una celda de polipropileno transparente, de 16 cm de ancho, 5,5 cm de alto y 6,5 cm de profundidad. Sobre dicha celda vamos a realizar 3 orificios equidistantes donde se colocan los alfileres, con una distancia de 2mm entre ellos para evitar el contacto tal y como se muestra en la Figura 18.

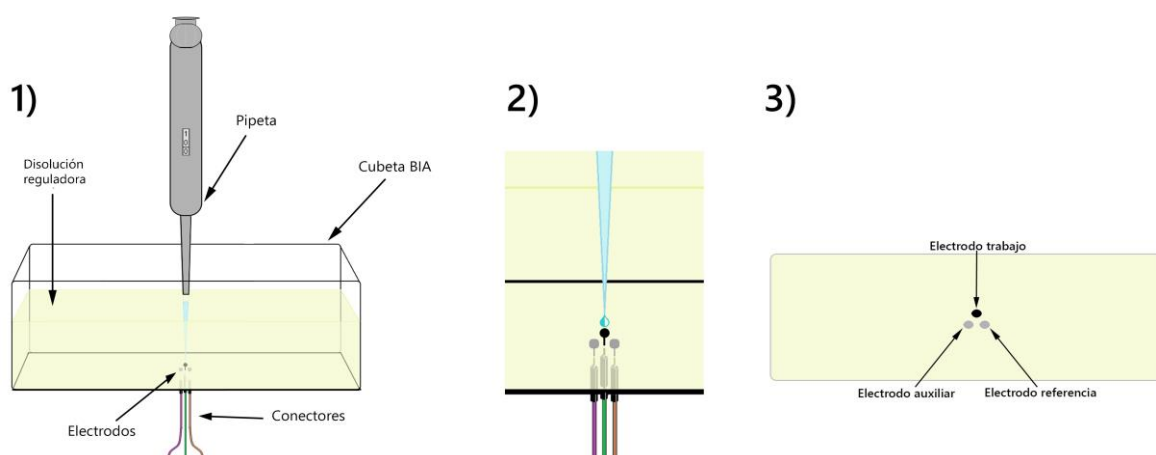


Figura 18: Distintas vistas del diseño de la celda BIA para detección electroquímica con electrodos basados en alfileres, incluyendo una pipeta manual. 1) Vista frontal de la celda BIA; 2) Vista cercana de la punta de micropipeta inyectando una disolución sobre el electrodo de trabajo; 3) Vista superior mostrando los electrodos de trabajo, auxiliar y referencia.

Los alfileres, situados atravesando el fondo de la celda BIA, se introducen en conectores cuyo extremo contrario es un cable que se conecta con una pinza o cocodrilo al potenciostato para la realización de las diversas medidas.

En la Figura 19 se esquematiza la reacción que ocurre al llevar a cabo una inyección de epinefrina sobre la superficie del electrodo de trabajo mientras se realiza una amperometría, donde los 2 electrones generados en la oxidación de la epinefrina son atraídos al electrodo de trabajo. El flujo de electrones produce un pico en el correspondiente registro $i-t$ (cronoamperograma), que a partir de ahora denominaremos biagrama.

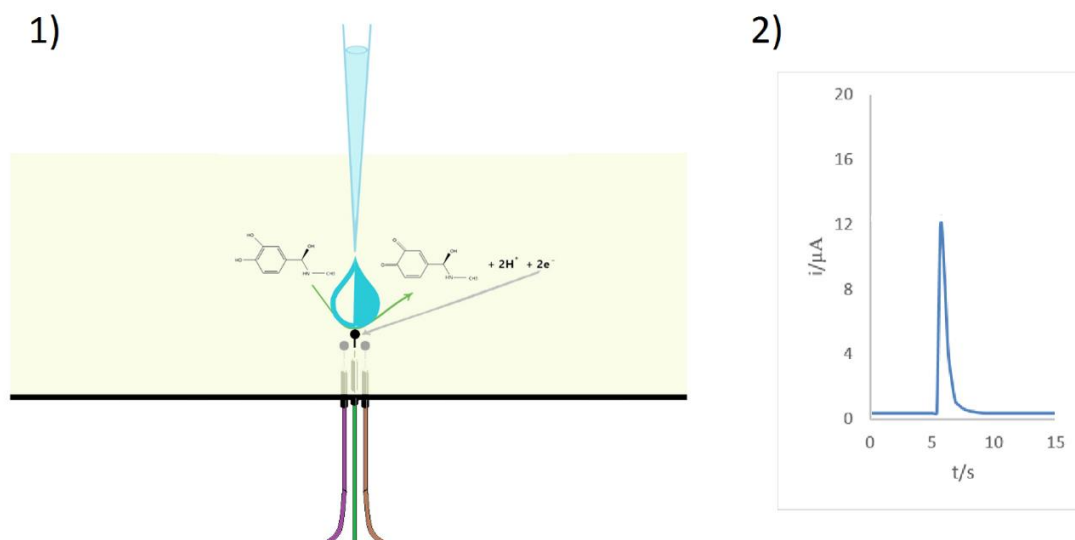


Figura 19: Esquema de la oxidación de la epinefrina sobre la superficie de la cabeza del alfiler que actúa como electrodo de trabajo (1) y biagrama que refleja la oxidación de dicha epinefrina en el electrodo de trabajo al inyectar $10 \mu\text{L}$ de epinefrina $0,5 \text{ mM}$ en el segundo 5 del biagrama (2).

4.2 Señal analítica

La señal analítica está constituida por la altura máxima del pico obtenido tras la inyección de analito sobre la cabeza del alfiler que actúa como electrodo de trabajo. En este apartado se comentarán aquellos parámetros iniciales desde los que iniciar el desarrollo del sistema BIA, tales como la disolución tampón o el potencial de detección para las amperometrías.

4.2.1 Selección de disolución tampón

Se desea evaluar el proceso electroquímico de la epinefrina 0,001 M en una celda de electrodos basados en alfileres. Dado que en el proceso están involucrados protones, el comportamiento electroquímico dependerá del pH de la disolución de trabajo. Las disoluciones de epinefrina son más inestables a valores de pH alcalino, por lo que se evalúan 2 valores de pH con 2 disoluciones: disolución reguladora PBS 0,01 M de pH 7, disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico 0,1 M de pH 5. Para ello se registran voltamperogramas cíclicos (CVs) realizando barridos de potencial en el electrolito de fondo y posteriormente en una disolución de epinefrina como se muestra en la Figura 20

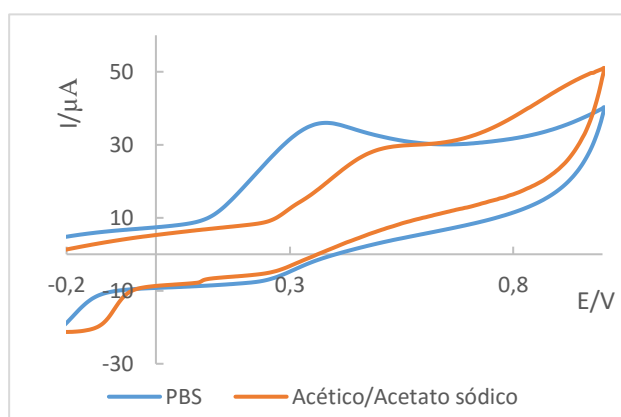


Figura 20: Comparación de voltamperogramas cíclicos registrados a 50 mV/s en distintas disoluciones: PBS 0,01M pH 7, acético/acetato sódico 0,1M pH 5 y Ácido sulfúrico 0,1M.

Dichos CVs se realizan colocando los tres alfileres de manera paralela, con el alfiler que actúa como electrodo de trabajo en el medio a una distancia de 2 mm entre ellos tal y como muestra la Figura 21. Se colocan sobre un papel de diapositiva para su correcta sujeción y permitir que los 40μL de disolución cubran las 3 cabezas de los alfileres.

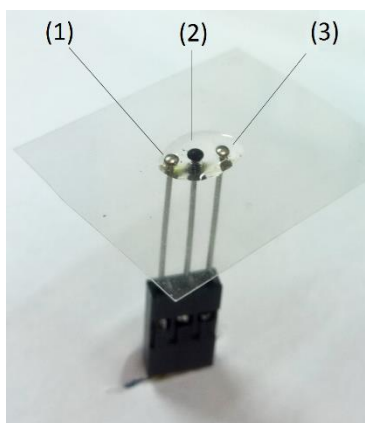


Figura 21: Disposición de los alfileres en línea a modo de electrodos de referencia (1), trabajo (2) y auxiliar (3).

Escogemos como electrolito de fondo para nuestro experimento la disolución tampón de PBS 0,01 M pH 7 debido a que es donde la epinefrina ofrece un mejor comportamiento. En la Figura 20 se observa como la CV de la epinefrina muestra un proceso mejor definido y a un potencial menor. Al estar involucrados protones, una disminución en su número (aumento de pH) desplaza el equilibrio hacia la derecha por lo que es necesaria más energía.

Posteriormente se llevan a cabo 5 voltamperogramas cíclicos sucesivos en el mismo alfiler, lavando la cabeza de los alfileres con agua MilliQ entre cada medida, para comprobar su precisión.

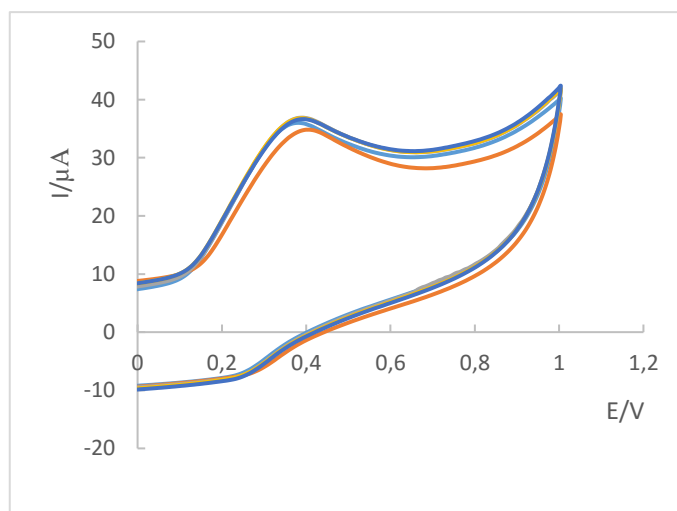


Figura 22: Precisión de voltamperogramas cíclicos registrados en 40 μL de una disolución de epinefrina 0,01 M en PBS 0,01 M pH 7 ($n=5$), velocidad de barrido de 50 mV/s.

Como se puede observar en la Figura 22, las medidas de epinefrina 1mM en la disolución reguladora de PBS reflejan una muy buena reproducibilidad, obteniendo una intensidad de oxidación o de pico anódico (i_{pa}) de 16.86 μ A y una desviación estándar relativa (DER) del 4,24 %, calculado como la relación entre la desviación estándar y el valor promedio en tanto por ciento.

Por último escogemos un potencial de detección para la amperometría de +0,50 V, puesto que es un poco mayor al potencial en el que se observa el pico anódico en la Figura 22.

4.3 Optimizaciones

Para el desarrollo del método vamos a ir seleccionando los diferentes parámetros que pueden tener influencia en la señal analítica, tanto de diseño (agitación...) como operacionales: el volumen de inyección, disolución reguladora...

Se registran diversos amperogramas (que llamaremos a partir de ahora biagramas, por su similitud con los fiagramas) en la celda BIA descrita anteriormente con 150 mL de disolución reguladora PBS 10 mM pH 7, con el fin de elegir una concentración adecuada a la que llevar a cabo los estudios de optimización. Para ello se varía la concentración de epinefrina entre 0,005 y 0,8 mM como muestra la Figura 23.

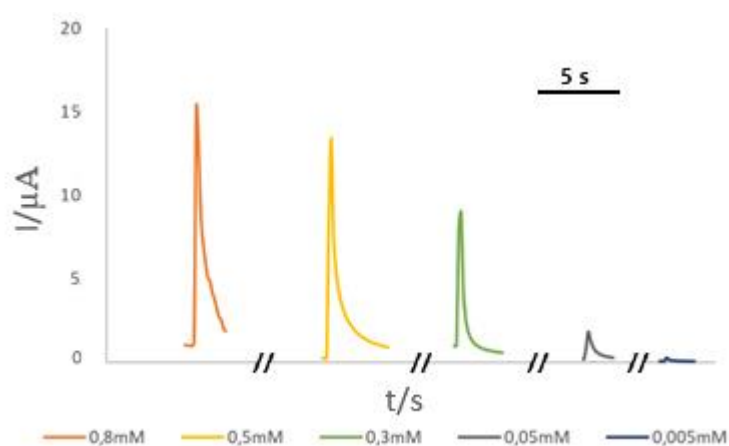


Figura 23: Intensidades de pico debidas a la oxidación de epinefrina a distinta concentración.

Potencial de detección: +0,50 V e inyección de 40 μL de epinefrina en 150 mL de PBS 10 mM pH 7.

Escogemos para continuar los estudios de optimización una concentración de epinefrina 0,5 mM debido a que presenta una intensidad similar a la obtenida para concentraciones mayores, pero lo suficientemente mayor que a concentraciones menores en las que desciende notablemente.

4.3.1 Agitación

En el análisis por inyección en un sistema estático, la sustancia electroactiva llega a la superficie electródica impulsada por la presión ejercida sobre el émbolo de la micropipeta y rápidamente difunde y es diluida en el electrolito de fondo.

La presencia de agitación favorecería el aporte del analito y los picos serían más estrechos. Con el fin de comprobar este efecto, llevamos a cabo una comparación entre inyecciones realizadas tanto con pipeta manual con agitación como con pipeta electrónica, en este último caso con y sin agitación, como podemos observar en la Figura 24.

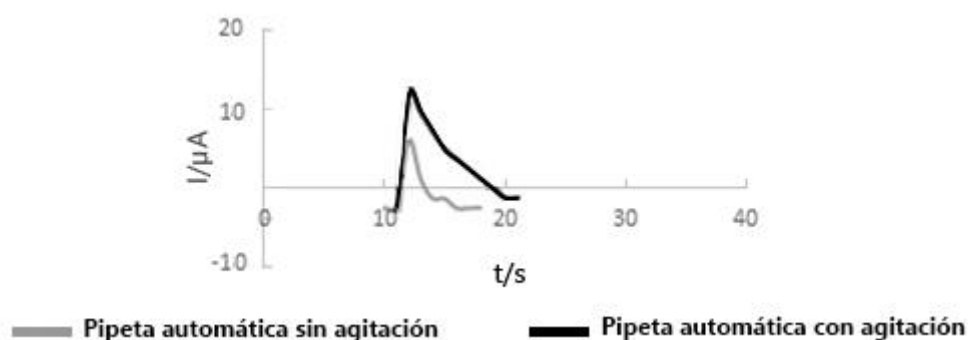


Figura 24 : Biogramas obtenidos al inyectar 40 μL de epinefrina 0,001 M en PBS 0,01 M pH 7 a potencial constante de +0,5 V en 150 mL de PBS 10 mM pH 7, en un sistema sin/con agitación.

Para conseguir dicha agitación, se coloca el agitador Heidolph MR2000 debajo de la celda, de manera que al incluir un pequeño imán dentro de la celda BIA se consiga un movimiento de la disolución reguladora. Cabe destacar que para la correcta agitación sería necesario equipamiento específico, el cual es costoso, para conseguir una agitación leve y homogénea en toda la celda.

Podemos observar una mayor intensidad de pico en aquella medida efectuada con la pipeta electrónica con agitación aunque es una señal transitoria de mayor anchura, es por ello que se va a usar la pipeta automática si no se indica lo contrario.

4.3.2 Evaporación

En caso de estar destapada, es posible la evaporación de la disolución reguladora de nuestra celda BIA, lo que podría afectar a la señal analítica. Debido a que el volumen empleado (150 mL) es suficientemente elevado, en este trabajo no se ha tenido en cuenta la posible evaporación al no verse de manera aparente sus efectos. Pese a ello, sería posible evitar la evaporación mediante el uso de algún material flotante como el corcho o similar que disminuyera el contacto de la superficie de la disolución reguladora con el aire.

Por otro lado, y para evitar el incremento excesivo del volumen de disolución reguladora en la celda BIA, sería posible la realización de un conducto de drenaje para mantener constante en todo momento el volumen máximo de la celda.

4.3.3 Inyección

La inyección es la operación más importante de la metodología en desarrollo por lo que se realiza la optimización de parámetros relacionados con la misma, como el volumen de inyección y la velocidad de dispensación.

4.3.3.1 Volumen de inyección

Con el fin de estudiar el efecto de este parámetro sobre la señal analítica, realizamos inyecciones de diversos volúmenes tanto con agitación como sin ella, desde 5 hasta 40 μL . Las señales obtenidas se representan en la Figura 25.

Hay un aumento significativo de la intensidad cuando se emplea agitación, pero se observa un mayor ancho de pico y peores datos de precisión (desviación estándar relativa, DER) al usar agitación a medida que disminuye el volumen de inyección.

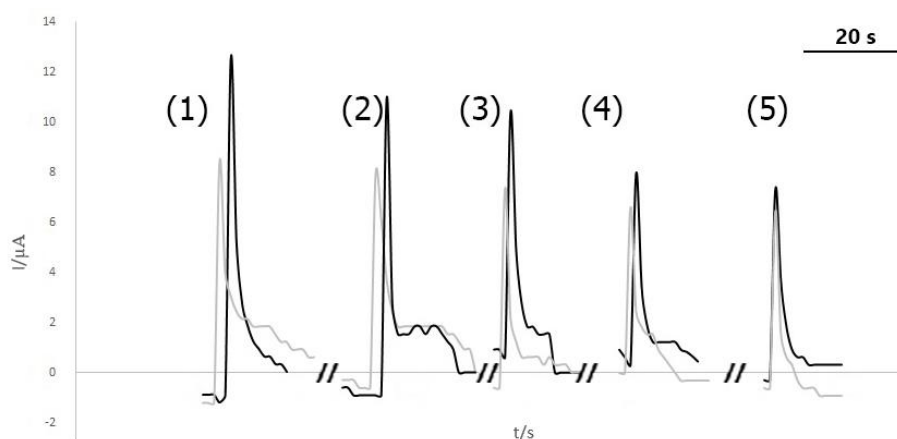


Figura 25: Biogramas registrados a +0,5 V para distintos volúmenes de inyección, con (negro) y sin (gris) agitación: 40 (1), 30 (2), 20 (3), 10 (4) y 5 μL (5) de una disolución de epinefrina 1 mM en 150 mL de PBS 0,01 M pH 7.

Por ello elegimos 10 μL como volumen de inyección para estudios posteriores, debido a que obtenemos una intensidad adecuada sin suponer un volumen de muestra elevado. No se observa una gran diferencia cuando se agita la disolución y por lo tanto, en estudios futuros no se agitará la disolución, lo que a su vez, simplifica el procedimiento.

4.3.3.2 Velocidad de inyección

Las medidas se realizan con una micropipeta electrónica automática que permite seleccionar la velocidad de inyección entre 5 opciones, siendo 1/5 la más lenta y 5/5 la más rápida. Este parámetro, la velocidad de dispensación (o inyección) en un sistema BIA es semejante a la velocidad de flujo en un sistema FIA. Se registran los biogramas a distintas velocidades de dispensación y cabe esperar que una mayor velocidad provocará una menor dispersión de la muestra y mayor señal analítica.

En la Figura 26 se representa la intensidad promedio (n=5 inyecciones usando siempre los mismo alfileres) de los picos de oxidación en función de la velocidad de la inyección.

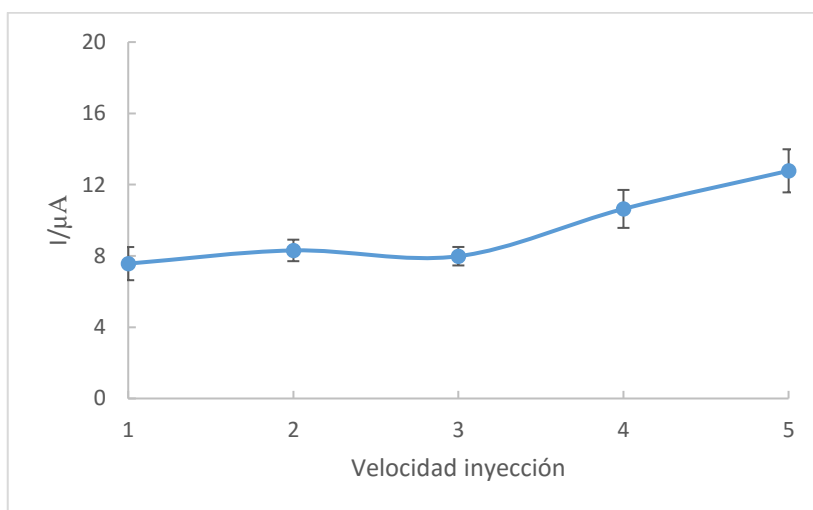


Figura 26: intensidad promedio de oxidación en función de la velocidad de inyección (siendo 1 el mínimo y 5 el máximo de velocidad) de 10 μL de epinefrina 0,001 M en 150 mL PBS 0,01 M pH 7 en biogramas registrados a potencial constante de +0,5 V (n=5 inyecciones, usando los mismos alfileres, las barras de error corresponden a una desviación estándar).

En la Figura 26 se puede apreciar como a medida que aumenta la velocidad de inyección se obtiene una mayor intensidad de oxidación.

En la Figura 27 se representa el promedio de la anchura de pico (desde la aparición del pico hasta que vuelve a la línea de base previa a la inyección) respecto a la velocidad de inyección.

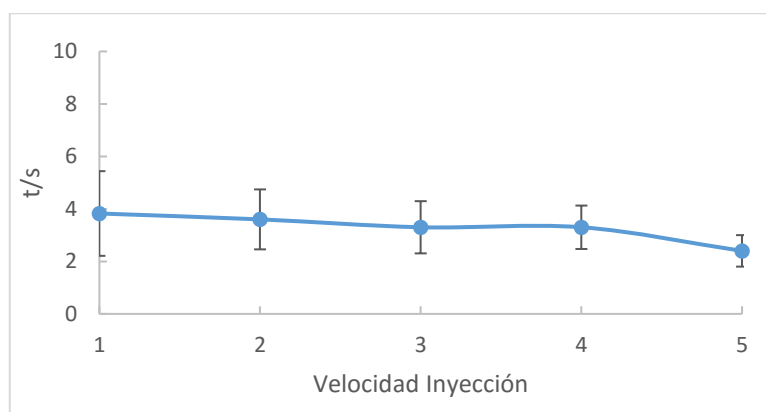


Figura 27: Anchura del pico en función de la velocidad de inyección, siendo 1 el mínimo y 5 el máximo de velocidad al inyectar 10 μL de epinefrina 0,001 M en 150 mL PBS 0,01 M pH 7 en amperometrías a potencial constante de +0,5 V ($n=5$ inyecciones, usando los mismos alfileres las barras de error corresponden a una desviación estándar).

Se puede apreciar cómo a medida que aumenta la velocidad de inyección disminuye ligeramente el tiempo necesario hasta volver a la línea de base, y de manera añadida, observamos una menor variabilidad en los tiempos a medida que aumentamos la velocidad de inyección.

Debido a estos efectos, tanto el ligero aumento de la intensidad, como la disminución de la anchura del pico conforme aumentamos la velocidad, decidimos emplear la máxima velocidad de inyección posible para las medidas, correspondiente a un valor de 5/5 en la micropipeta electrónica.

4.3.4 Potencial de detección

Con el fin de elegir el potencial de detección más adecuado, se realiza una curva hidrodinámica, que se muestra la Figura 28. La curva hidrodinámica (curva de intensidad frente a potencial) se realiza registrando sucesivos biogramas, a diferentes potenciales y midiendo la intensidad de los picos obtenidos. Es de esperar obtener una curva con dos zonas delimitadas, una de ellas en la que a mayor potencial obtenemos cada vez más intensidad y otra donde se alcanza una meseta, debido a que la sustancia ha llegado a la máxima velocidad de transferencia electrónica.

Para su realización se inyectaron 10 μL de una disolución de epinefrina 0,5 mM en la cubeta BIA conteniendo 150 mL de disolución tampón PBS 10 mM pH 7 y aplicando potenciales comprendidos entre +0,1 V y +0,7 V frente a un electrodo de cuasi-referencia de acero inoxidable. Cada punto de la gráfica representa el valor promedio de 3 inyecciones.

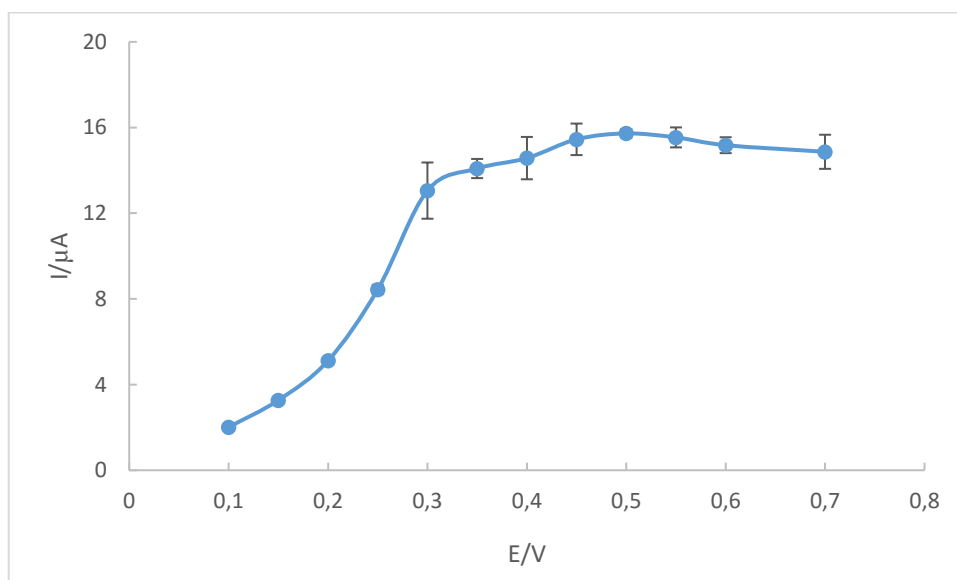


Figura 28: Curva hidrodinámica realizada inyectando una disolución de epinefrina 0,5 mM con la máxima velocidad de dispensación en 150 mL de disolución reguladora 150 mL PBS 10 mM pH 7. La barra de error corresponde a una desviación estándar de 3 medidas y usando siempre los mismos alfileres.

Podemos ver como a partir de +0,45 V aproximadamente se alcanza una meseta. Elegimos como potencial de detección de epinefrina, un valor un poco superior +0,55 V, lo suficientemente alto para garantizar la oxidación de la epinefrina y la precisión de las medidas si hay alguna variación ligera de potencial. Por otra parte, se evitan potenciales mayores con posibles interferencias de oxidaciones de otras especies.

Esta curva se realizó también con la micropipeta manual y se aprecia una mayor intensidad, si bien la desviación de las medidas, precisamente por su carácter manual, es muy elevada, dado que se hace mucho más difícil controlar la velocidad de dispensación. Dicha desviación es mucho menor en la curva realizada con la pipeta electrónica, pese a obtener una menor intensidad. Por otra parte, en ambas gráficas se aprecia como la curva tiene una forma semejante, con una meseta alcanzada al aplicar potenciales iguales o mayores a +0,4 V.

4.4 Volumen de disolución reguladora

El volumen de la disolución reguladora debería ser elevado frente al volumen de inyección para: i) favorecer la dilución de las disoluciones una vez sucede el proceso electroquímico, ii) obtener picos más estrechos y iii) evitar la contaminación por productos de oxidación que difunden hacia la disolución. Para seleccionar el volumen de la disolución reguladora en la cubeta BIA nos vamos a fijar tanto en la intensidad de los picos obtenidos, como en el tiempo que tarda la inyección en volver a línea de base.

Realizamos 5 medidas en diferentes volúmenes de disolución reguladora, desde 100 hasta 350 mL. Volúmenes menores no cubren de manera completa los electrodos y volúmenes mayores implican empleo de recipientes demasiado grandes.

En la Figura 29 se representan las intensidades promedio correspondientes a 5 medidas de los picos de oxidación obtenidos para cada volumen de disolución reguladora en la cubeta BIA.

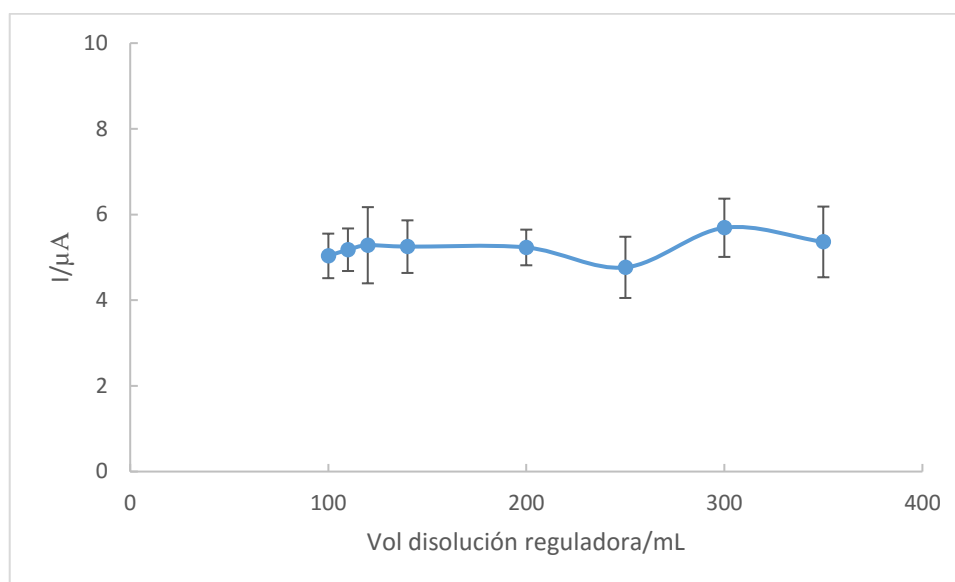


Figura 29: Intensidades promedio de picos de oxidación de 10 μ L de epinefrina 0,5 mM en PBS 0,01 M pH 7 para cada volumen de disolución reguladora en amperometrías a +0,55 V a máxima velocidad de inyección ($n=5$ inyecciones, usando los mismos alfileres las barras de error corresponden a una desviación estándar).

Se puede apreciar una intensidad de oxidación prácticamente constante en todas las medidas en función del volumen de disolución reguladora en la cubeta.

En las mismas medidas efectuadas y comentadas anteriormente, se ha medido el tiempo que tarda la intensidad en volver a la línea de base anterior a la inyección, recogiendo los resultados en la Figura 30.

Se observa que desde 100 hasta 350 mL de disolución reguladora, se obtienen picos cuya duración oscila entre 2 y 3 s, por lo que vemos que no es un factor determinante.

Lo que podemos estimar con la Figura 30 es la frecuencia de muestreo. Tomando 3 s como una duración aproximada de cada pico, se pueden llegar a hacer 1200 inyecciones/hora trabajando de manera continua.

$$\text{Inyecciones en 1h} = \frac{1 \text{ inyección}}{3 \text{ s}} \times \frac{60 \text{ s}}{1 \text{ min}} \times \frac{60 \text{ min}}{1 \text{ h}} = 1200 \text{ inyecciones/h}$$

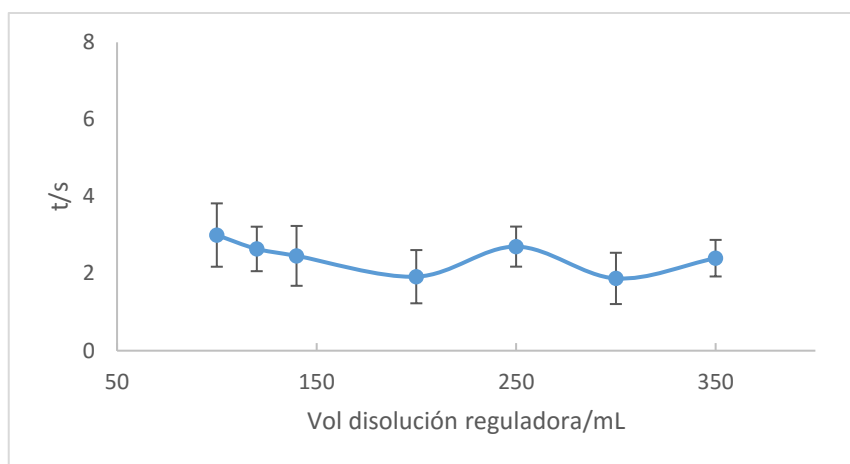


Figura 30: Anchura de los picos recogidos en los biogramas correspondientes a inyecciones de 10 μL de epinefrina 0.5 mM en PBS 0,01 M pH 7 para cada volumen de disolución reguladora (n=5, barras de error correspondientes a una desviación estándar, potencial de detección: +0,55 V, máxima velocidad de dispensación)

Viendo los resultados obtenidos se han seleccionado 200 mL como volumen de disolución reguladora empleado en la cubeta, puesto que es el volumen mayor con el que se obtiene una alta precisión, permitiendo realizar un gran número de inyecciones.

4.5 Características de la metodología analítica

Tras los estudios descritos previamente, se han seleccionado como óptimas las siguientes condiciones experimentales:

- Diluciones en disolución tampón PBS 10 mM pH 7
- Concentración de epinefrina: 0,5 mM
- Volumen de inyección: 10 μ L
- Agitación: No
- Volumen de disolución reguladora: 200 mL
- Velocidad de inyección: 5/5 (máxima)
- Potencial de detección +0,55 V

4.5.1 Curva de calibrado

Realizamos la recta curva de calibración en un intervalo de concentración de epinefrina comprendido entre 0,001 y 0,6 mM con pipeta automática electrónica, y bajo las condiciones experimentales comentadas anteriormente. En la *Figura 31* se representa la intensidad de corriente del máximo frente a la concentración.

Se realizó el calibrado también con la pipeta manual, observando resultados semejantes en ambos casos, siendo reseñable una mayor precisión para la curva efectuada con la pipeta electrónica.

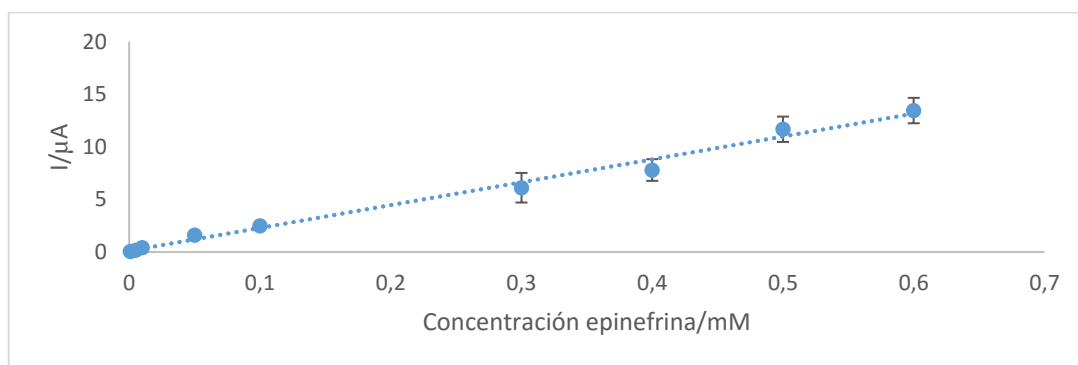


Figura 31: Recta de calibrado efectuada con pipeta electrónica automática a máxima velocidad de inyección de 10 μL de epinefrina en PBS 0,01 M, pH 7 y un potencial de detección de +0,55 V (n=3). Las barras de error corresponden a una desviación estándar.

La recta de calibrado sigue la ecuación:

$$I (\mu A) = 21,739 (\mu A / mM) [Epinefrina] (mM) + 0,1173 (\mu A);$$

$$R^2 = 0,9902$$

Ha habido linealidad en todo el intervalo de concentraciones estudiado, desde 0,001mM hasta 0,6 mM.

El límite de detección o LOD es calculado como tres veces la desviación estándar del blanco dividido entre la pendiente. Usamos el último orden de magnitud (entre 0,001 y 0,01mM) para calcular la desviación estándar del blanco).

$$LOD = 0,0001 \text{ mM}$$

La sensibilidad es la pendiente de la curva de calibrado, y en este caso corresponde a 22 μA/mM.

4.5.2 Precisión

4.5.2.1 Precisión entre electrodos

Con el fin de conocer la precisión de la metodología, se han realizado diversos estudios que se detallan a continuación.

En primer lugar, se han realizado 60 inyecciones de 10 μL de epinefrina 0,5 mM en 200 mL de PBS 0,01 M de pH 7 con un potencial de detección de +0,55 V con la misma celda, mismos electrodos y misma disolución reguladora de manera consecutiva sin interrupciones tal y como se muestra en el biagrama de la *Figura 32*.

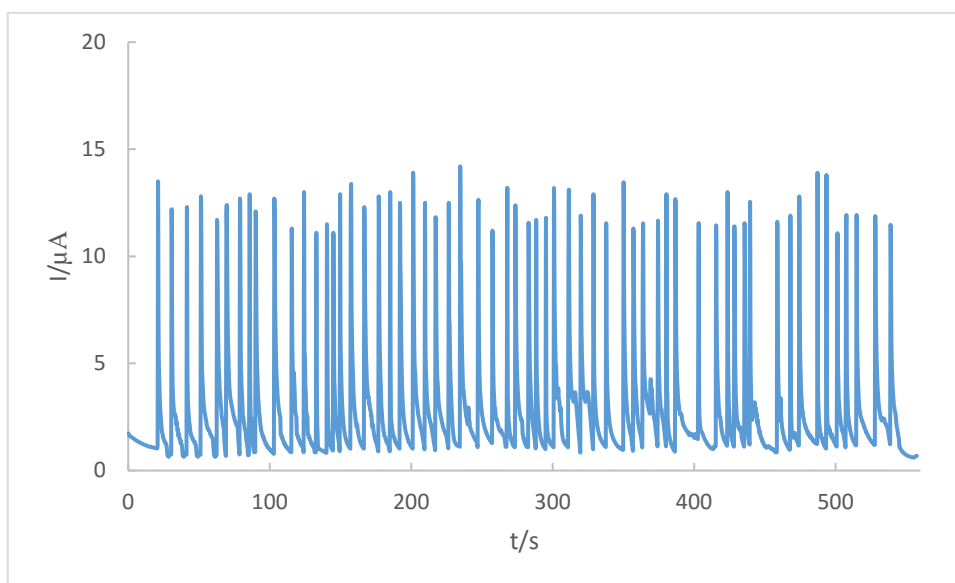


Figura 32: Biagrama de 560 segundos con 60 inyecciones (máxima velocidad de dispensación) de 10 μL de epinefrina 0,5 mM en 200 mL PBS 0,01 M pH 7 y un potencial de detección de +0,55 V con la misma celda y electrodos.

Se ha obtenido para los valores de intensidades del biagrama de la *Figura 32* una intensidad media de 12,33 μA con una desviación estándar relativa (DER) del 6,5 % para 60 inyecciones consecutivas con la misma celda, disolución reguladora y electrodos.

Por otro lado, se han efectuado 7 biagramas independientes con la misma celda electroquímica, es decir, mismos electrodos de trabajo, referencia y auxiliar así como la misma disolución reguladora. Se han realizado 7 registros con 7 inyecciones cada uno en diferentes días. Los biagramas se muestran en la *Figura 33*.

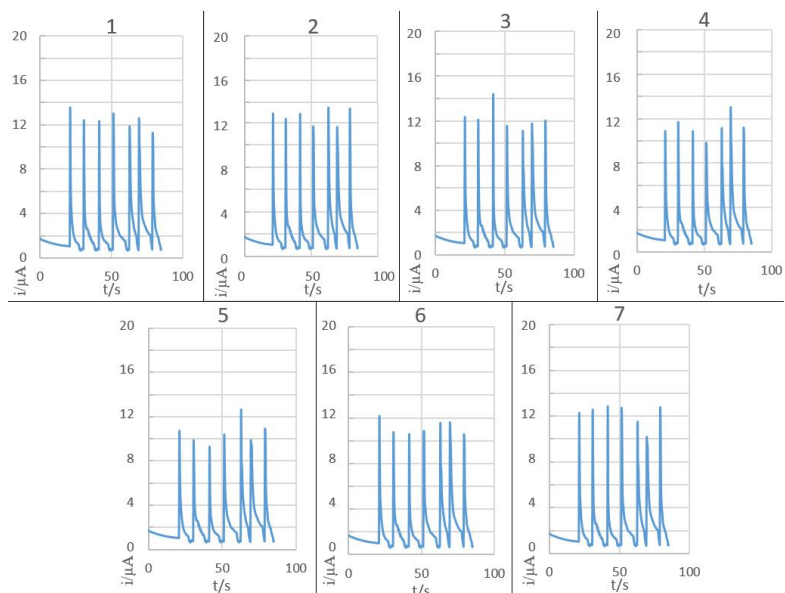


Figura 33: Biagramas correspondientes a procesos de registro independientes con 7 inyecciones a máxima velocidad de $10 \mu\text{L}$ de epinefrina $0,5 \text{ mM}$ en 200 mL PBS $0,01 \text{ M}$ pH 7 y un de detección de $+0,55 \text{ V}$. Están realizados con la misma celda, disolución reguladora y electrodos en todos los casos.

En la Figura 34 se representan las intensidades promedio de los 7 biagramas representados en la con 7 inyecciones cada uno. Se ha obtenido una intensidad media de $11,59 \mu\text{A}$ con una DER del $6,6 \%$, concordante con el resultado anterior, por lo que no se observa na variación entre medidas realizadas en distintos días con la misma celda electroquímica.

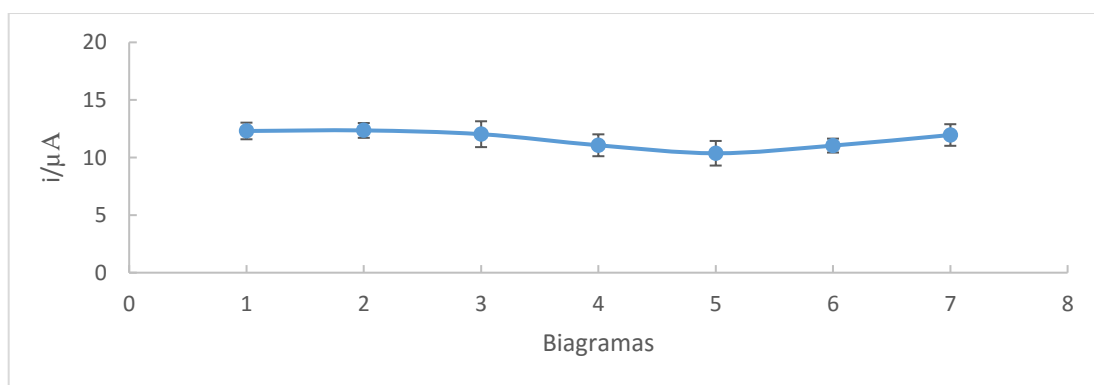


Figura 34: Intensidades de oxidación correspondientes a inyecciones de $10 \mu\text{L}$ de epinefrina $0,5 \text{ mM}$ en 200 mL PBS $0,01 \text{ M}$ pH 7 y un potencial de detección de $+0,55 \text{ V}$ para 7 procesos de medida diferentes con la misma celda, disolución reguladora y electrodos en todos los caso, y 7 inyecciones en cada registro a máxima velocidad de inyección.

Posteriormente, se realizaron 20 inyecciones, 10 de ellas para una concentración de epinefrina 0,25 mM y otras 10 para una concentración 0,8 mM de manera alterna con la misma celda electroquímica, para comprobar que el electrodo mide de manera precisa, y no hay productos de oxidación que se adsorban sobre la superficie del electrodo de trabajo e impidan la transferencia electrónica. Los resultados se muestran en la Figura tal y como se muestra en la *Figura 35*.

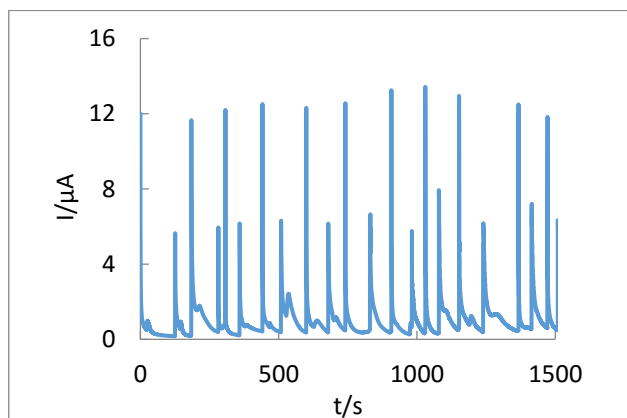


Figura 35: Biograma con inyecciones (a máxima velocidad) intercaladas de 10 µL de epinefrina 0,25 mM y 0,8 mM en tampón PBS 10 mM pH 7 y un potencial de detección de +0,55 V.

Para las 10 inyecciones de 10 µL de epinefrina 0,25 mM, se obtuvo una intensidad de oxidación promedio de 5,72 µA con una DER del 7,6%. En el caso de las 10 inyecciones de 10 µL de epinefrina 0,8 mM, la intensidad de oxidación promedio fue de 12,0 µA, con una DER del 5,1 %.

Con los mismos electrodos empleados en los estudios de precisión descritos en el inicio de este apartado 4.7.1 se han realizado 45 inyecciones para comprobar la precisión y estabilidad de la celda y los electrodos tras efectuar múltiples medidas como se muestra en la *Figura 36*.

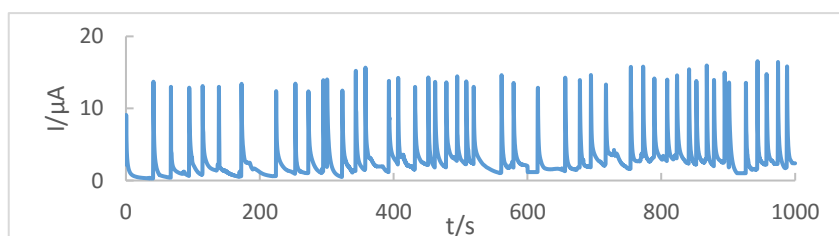


Figura 36: Respuesta amperométrica para la epinefrina en la cubeta BIA. Cada pico se corresponde a la inyección de epinefrina 0.5 mM en el buffer de PBS 10 mM pH 7, al aplicar un potencial de +0,55 V (máxima velocidad de dispensación).

Podemos observar que hay una muy ligera elevación de la línea de base tras 45 medidas usando los mismos electrodos y disolución reguladora, que puede deberse a la acumulación de sustancias susceptibles de ser oxidadas o incluso a la oxidación del electrolito de fondo, pero en cualquier caso, no afecta a la precisión de la medida. A lo largo del biagrama de 1000 segundos de duración se obtienen valores precisos, obteniendo una intensidad de oxidación promedio de $14,08 \mu\text{A}$ con una DER del $7,7 \%$ pudiendo obtener gran número de medidas en un corto espacio de tiempo.

Aunque la precisión intraelectrodo es muy buena, es importante conocer la precisión entre varias celdas electroquímicas diferentes. Dado que los alfileres son elementos producidos en masa y de bajo coste pueden ser considerados desechables siempre y cuando la precisión sea buena.

Para esa precisión de varias celdas electroquímicas hemos realizado 7 biagramas diferentes, cuyos resultados comparados se muestran en la *Figura 37*, realizados con celdas electroquímicas diferentes en cada caso con electrodos y disolución reguladora nuevos.

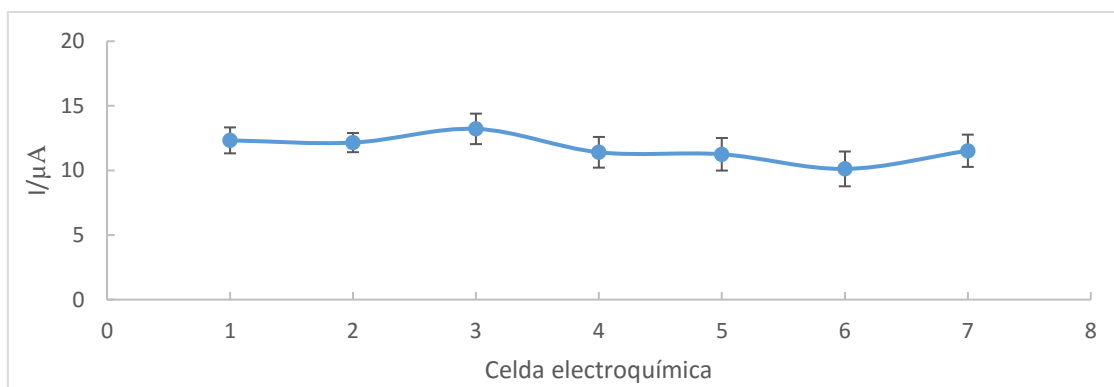


Figura 37: Intensidades de oxidación de inyecciones de $10 \mu\text{L}$ de epinefrina $0,5 \text{ mM}$ en $200 \text{ mL PBS } 0,01 \text{ M pH } 7$ y un potencial aplicado de $+0,55 \text{ V}$ para 7 registros diferentes con electrodos nuevos en cada caso. Las barras de error corresponden a la desviación estándar para 7 inyecciones.

Se ha obtenido un valor promedio de $11,71 \mu\text{A}$ con una DER del $9,4 \%$ para los 7 registros diferentes con 7 inyecciones en cada caso.

4.6 MultidetECCIÓN

Es cada vez más importante el desarrollo de dispositivos "multiplexados" que permitan la realización de varias medidas simultáneamente o la determinación multianalito. En este contexto y en este apartado se pretende abordar la adaptación del sistema de análisis por inyección en un sistema estático o BIA para la inyección y detección múltiple con una pipeta multicanal de 8 vías.

4.6.1 Diseño de la celda

En este apartado se va a comentar el diseño propio realizado para alojar la celda electroquímica basada en alfileres, que permita la detección múltiple de epinefrina. Es una evolución de la celda comentada anteriormente en el apartado 4.1. Debido a que empleamos una pipeta electrónica de 8 canales, hemos decidido hacer 8 medidas simultáneas para aprovechar las posibilidades de la multipipeta. Además se emplea un multipotenciostado que permite la conexión de 8 celdas electroquímicas, bien independientes o compartiendo electrodo referencia y auxiliar (incorporando 8 electrodos de trabajo). En este caso, se colocan 8 alfileres de acero inoxidable en el fondo de la celda, modificados con tinta de carbono como se ha descrito en el apartado 3.3.1 y con una separación entre ellos de 9mm, que se corresponde con la distancia que hay entre las puntas de la pipeta multicanal.

Como electrodos auxiliar y de referencia, con el fin de obtener una celda BIA lo más sencilla posible, se ha decidido utilizar hilo de acero inoxidable de manera que éstos son comunes para los 8 electrodos de trabajo tal y como se muestra en la Figura 38.

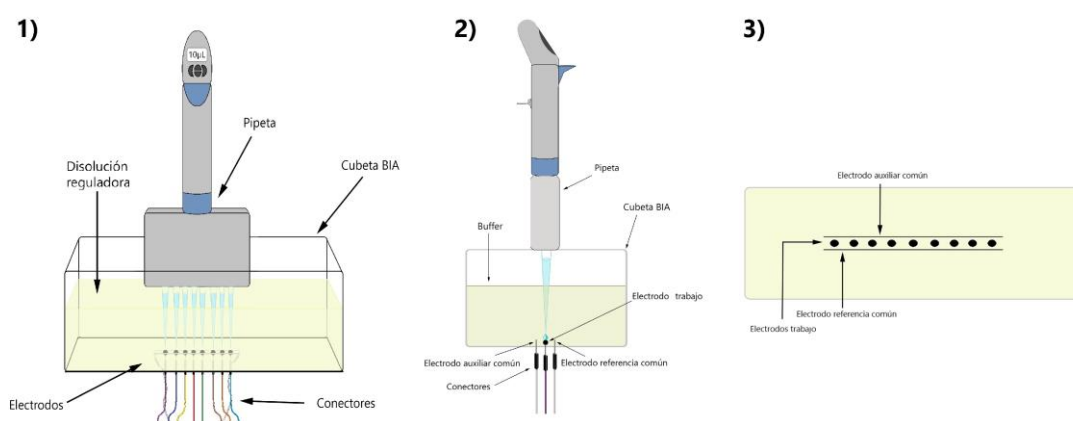


Figura 38: Distintas vistas del diseño de la celda BIA para la multidetección electroquímica con 8 electrodos basados en alfileres, incluyendo una pipeta multicanal electrónica. 1) Vista frontal de la celda BIA; 2) Vista

lateral de la celda BIA inyectando sobre el electrodo de trabajo; 3) Vista superior mostrando electrodos de trabajo, auxiliar y referencia.

Los alfileres, situados atravesando el fondo de la celda BIA, se introducen en conectores cuyo extremo contrario es un cable el cual se conecta a la pinza o cocodrilo proveniente del propio potenciostato para la realización de las diversas medidas.

En la Figura 39 se detalla la reacción que ocurre al llevar a cabo una inyección de epinefrina sobre la superficie del electrodo de trabajo mientras se realiza una amperometría, donde los 2 electrones generados en la oxidación de la epinefrina son transferidos al electrodo de trabajo generando una corriente que aparece como un pico en el cronoamperograma o biagrama.

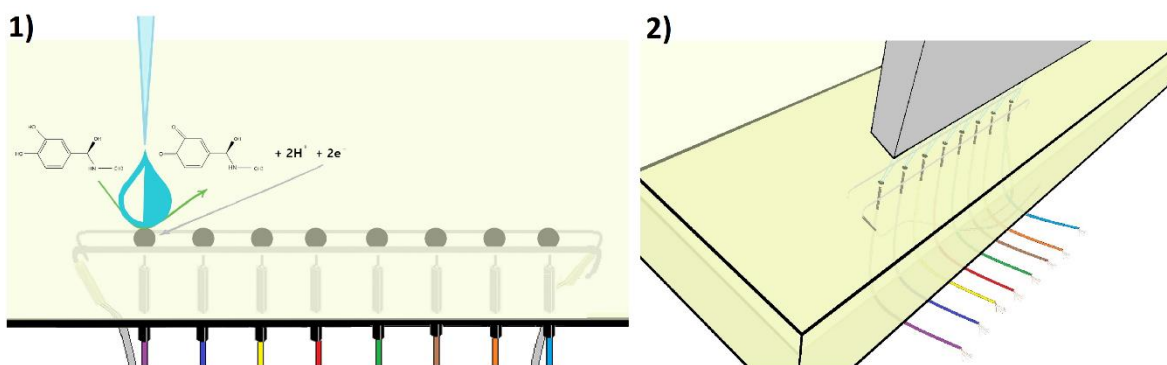


Figura 39: Esquema de la oxidación de la epinefrina sobre la superficie de la cabeza del alfiler que actúa como electrodo de trabajo en el sistema de multidetección (1) y, vista desde la perspectiva superior izquierda de la celda mostrando la colocación de la pipeta multicanal (2).

4.6.2 Precisión de la celda

Se han realizado tres inyecciones sobre la cabeza de los 8 electrodos de trabajo como prueba de concepto para comprobar si el sistema de multidetección del sistema BIA con electrodos de acero inoxidable funciona de manera correcta.

Para ello se decidió hacer la inyección a una distancia de 3 mm, lo cual es algo mayor que los 2 mm de distancia empleados en la celda con una única medida. Esta decisión se debe a la dificultad para alinear las 8 puntas de la micropipeta con los 8 electrodos de trabajo.

En la Figura 40 se muestra las intensidades de oxidación promedio correspondiente a la detección simultánea con los 8 electrodos de trabajo para 3 inyecciones de epinefrina 0,5 mM.

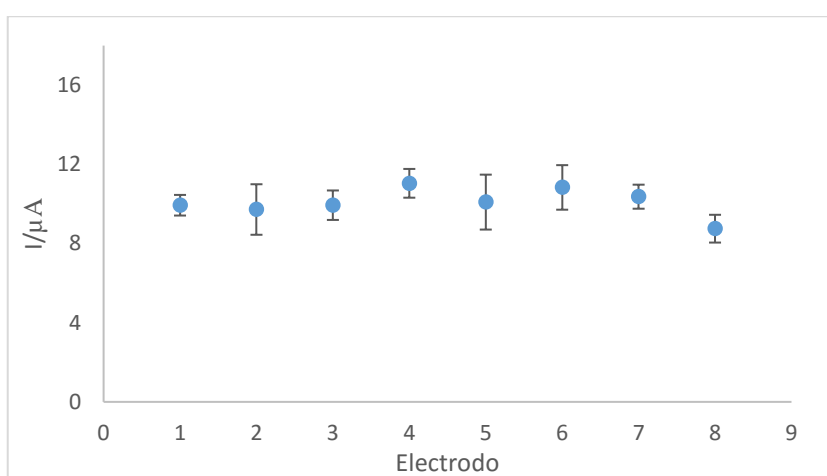


Figura 40: intensidades de oxidación promedio de 10 μL de epinefrina 0,5 mM en 200 mL PBS 0,01 M pH 7 y un potencial aplicado de +0,55 V para 3 inyecciones.

De las 3 inyecciones para cada electrodo, se han obtenido los siguientes resultados:

Tabla 2: Resultados para el biagrama con detección simultánea de 3 inyecciones (a máxima velocidad de inyección) de 10 μL de epinefrina 0,5 mM en 200 mL de PBS 0,01 M pH 7 y un potencial aplicado de +0,55 V.

Electrodo	Promedio (μA)	Desviación Estándar (μA)	DER (%)	n
1	9,936	0,521	5,25	3
2	9,720	1,277	13,14	3
3	9,937	0,745	7,49	3
4	11,043	0,726	6,58	3
5	10,093	1,388	13,75	3
6	10,835	1,125	10,39	3
7	10,367	0,607	5,86	3
8	8,751	0,702	8,02	3

En la Tabla 2 se aprecia que en todos los electrodos se obtiene una desviación estándar relativa (DER) menor del 15 %.

De manera global, haciendo el promedio de los 8 electrodos para compararlos entre ellos hemos obtenido una intensidad de oxidación promedio de 10,08 μA con una DER del 7,03 %. Se puede recordar que para 7 celdas electroquímicas distintas con medidas realizadas en distintos días (apartado 4.7.1 de esta memoria) se había obtenido un valor promedio de intensidad de 11.71 μA con una DER del 9.4 % para 7 registros diferentes con 7 inyecciones en cada caso, lo que indica una gran concordancia entre los valores de intensidades y robustez de la metodología.

5. Conclusiones y perspectivas de futuro

En este trabajo se ha presentado por primera vez un dispositivo BIA con detección electroanalítica de bajo coste basado en el uso de alfileres de acero inoxidable.

Se ha diseñado un sistema electroanalítico rápido, con una elevada frecuencia de muestreo (1200 h^{-1}), simplemente con el empleo de una cubeta y de alfileres de acero inoxidable como electrodos de trabajo (modificado con tinta de carbono), referencia y auxiliar. De esta manera, en apenas unos minutos y bajo las condiciones óptimas se puede obtener una recta de calibrado y las señales correspondientes a disoluciones de muestra, que por interpolación en la recta permitirían conocer la concentración de la muestra. Como prueba de concepto, se ha utilizado epinefrina como analito modelo y se han optimizado diferentes variables de diseño e instrumentales. No ha sido necesario el empleo de agitación y la mayor precisión de las medidas se ha conseguido con la máxima dispensación de la micropipeta.

No sólo es posible realizar medidas en un único sistema sino que puede diseñarse un sistema para multimedidas empleando simultáneamente 8 electrodos de trabajo y compartiendo electrodo de referencia y auxiliar. El sistema se puede asociar con el empleo de una pipeta automática multicanal y un multipotenciostato lo que lo hace muy adecuado para la simultaneización de las medidas.

La precisión tanto de la celda electroquímica única (diferentes inyecciones con la misma celda o con celdas diferentes) así como del sistema múltiple es muy adecuada con valores de DER por debajo de 10 y 15 % para el sistema único y múltiple respectivamente.

La estrategia propuesta puede ser aplicada al control de calidad de la industria farmacéutica. No sólo es un método sencillo y rápido sino que permite un ahorro de reactivos y materiales considerable, al mismo tiempo que genera pocos residuos. La gran sensibilidad de las técnicas amperométricas junto con la sencillez de la instrumentación requerida la hace muy adecuada para múltiples aplicaciones.

Tras la construcción de esta celda BIA de bajo coste de detección sencilla se pueden plantear varias perspectivas de futuro:

- Aplicar el sistema desarrollado al control analítico de fármacos y también, como prueba de concepto, para la determinación de epinefrina en fluidos biológicos. Cabe esperar que la dilución producida en la disolución reguladora sea muy beneficiosa para mantener limpia la superficie electródica.
- Revisar el diseño de la celda BIA sobre todo en lo que respecta a la adición de un sistema de drenaje, agitación, empleo de una pipeta programable...
- Por lo que respecta a los alfileres de acero inoxidable como transductores, el paso lógico para incrementar la sensibilidad de la metodología es la modificación con nanomateriales o algún tipo de pretratamiento como puede ser con plasma de oxígeno.
- Aplicar esta plataforma para el desarrollo de biosensores que sirvan para determinar analitos diversos, incluyendo la evaluación del desarrollo de un sistema BIA para medios orgánicos como aceites.

6. Bibliografía

1. Albareda-Sirvent, M., Merkoçi, A., & Alegret, S. (2000). Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. *Sens. Actuators B: Chem.*, *69(1)*, 153-163.
2. Bhand, S., Danielsson, B., & Yakovleva, M. (2013). The enzyme thermistor--a realistic biosensor concept. A critical review. *Analytica Chimica Acta*, *766*, 766, 1-12.
3. Biscay, J., Costa Rama, E., García, M., Carrazón, J., & Costa-García, A. (2011). Enzymatic Sensor Using Mediator-Screen-Printed Carbon Electrodes. *Electroanalysis*, *23*, 209-214.
4. Brett, C., & Fungaro, D. (1999). Microelectrode arrays: application in batch-injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 257-264.
5. Cárdenas, M., & Valcárcel, M. (2000). *Automatización y Miniaturización en Química Analítica*. Springer.
6. Costa Rama, E., Costa-García, A., & Fernández-Abedul, M. (2016). Pin-based flow injection electroanalysis. *Analytical Chemistry*, To be published.
7. Deftereos, N., Calokerinos, A., & Efstathiou, C. (1993). Flow-injection chemiluminometric determination of Epinephrine, Norepinephrine, Dopamine and L-Dopa. *Analyst*, *118*, 627-632.
8. Diagnostics for All. (2016). <http://dfa.org/>. Recuperado el 16 de 06 de 2016, de <http://dfa.org/>
9. Domínguez Renedo, O., Alonso-Lomillo, M., & Arcos Martínez, M. (2007). Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta*, *73*, 202-219.
10. Dropsens. (2016). <http://www.dropsens.com/>. Recuperado el 15 de 06 de 2016, de http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html

11. Du, D., Zou, Q.-C., & Wang, S.-F. (2002). Electrochemical behavior of epinephrine at l-cysteine self-assembled monolayers modified gold electrode. *Talanta*, 687-692.
12. Escarpa, A., M.C., G., & López, M. (2015). *Agricultural and Food Electroanalysis* (1st ed.). Wiley.
13. Fernandez Pereira, P., Cardoso Marra, M., Barbosa Lima, A., Torres Pio dos Santos, W., Muñoz, R., & Richter, E. (2013). Fast and simultaneous determination of nimesulide and paracetamol by batch injection analysis with amperometric detection on bare boron-doped diamond electrode. *Diamond & Related Materials*, 39, 41-46.
14. Gan, N., Yang, X., Xie, D., Wu, Y., & Wen, W. (2010). A Disposable Organophosphorus Pesticides Enzyme Biosensor Based on Magnetic Composite Nano-Particles Modified Screen Printed Carbon Electrode. *Sensors*, 10, 625-638.
15. Glavan, A., Ainla, A., Hamedi, M. M., Fernández-Abedul, M. T., & Whitesides, G. (2016). Electroanalytical devices with pins and thread. *Lab on a Chip*(16), 112-119.
16. Gubala, V., Harris, L., Ricco, A., Tan, M., & Williams, D. (2011). Point of Care Diagnostics: Status and Future. *Analytical Chemistry*, 84, 487-515.
17. Hawley, M., Tatawawadi, S., Piekarski, S., & Adams, R. (1967). Electrochemical studies of the oxidation pathways of catecholamines. *Journal Analytical Chemistry*, 89, 447-450.
18. Jiang, J.-H., Pang, P.-F., Shen, G.-L., Yu, R.-Q., & Zhang, Y. (2009). Electrochemical Aptasensor Based on Proximity-Dependent Surface Hybridization Assay for Protein Detection. *Electroanalysis*, 21, 1327-1333.
19. Kaneko, M., & Isaacs, H. (2000). Pitting of stainless steel in bromide, chloride and bromide/chloride solutions. *Corrosion Science*, 42, 67-78.

20. Lambert, C., Milkani, E., & Morais, S. (2010). Detection of oligonucleotide systematic mismatches with a surface plasmon resonance sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, *25*, 1217-1220.
21. Luczac, T. (2009). Epinephrine oxidation in the presence of interfering molecules on gold nanoparticles and thiodipropionic acid in aqueous solution. *Electroanalysis*, *21*, 2557-2562.
22. Martin, R., Pasas, S., & W.R., V. (2002). Recent developments in amperometric detection for microchip capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, *23*, 3667-3677.
23. Micrux. (2016). <http://www.micruxfluidic.com/es/>. Recuperado el 15 de 06 de 2016, de http://www.micruxfluidic.com/es/productos-sensores_electroquimicos.html#se
24. Mishra, A., Upadhyay, A., Patra, A., Chaudhury, S., & Chattopadhyay, P. (2009). Simultaneous Determination of Epinephrine and Norepinephrine by High Performance Liquid Chromatography. *Sci. Pharm*, *77*, 367-374.
25. Neves, M., González-García, M., a Nouws, H., & Costa-García, A. (2012). celiac disease detection using a transglutaminase electrochemical immunosensor fabricated on nanohybrid screen-printed carbon electrodes. *Biosens. Bioelectron.*, *31*, 95-100.
26. Oliveira, G., Tormin, T., Sousa, R., de Oliveira, A., de Morais, S., Richter, E., & Muñoz, R. (2016). Batch-injection analysis with amperometric detection of the DPPH radical for evaluation of antioxidant capacity. *Food Chemistry*, *192*, 691-697.
27. Quintino, M., Araki, K., Toma, H., & Angnes, L. (2002). Batch Injection Analysis Utilizing Modified Electrodes with Tetraruthenated Porphyrin Films for Acetaminophen Quantification. *Electroanalysis* , *14*, 1629-1634.

28. Quintino, M., Corbo, D., Bertotti, M., & Angnes, L. (2002). Amperometric detection of acetylsalicylic acid in drugs by batch injection analysis at a copper electrode in alkaline solutions. *Talanta*, *58*, 943-949.
29. Ruzicka, J., & Hansen, E. (1975). Flow Injection analyses. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Analytica Chimica Acta*, *78*, 145-157.
30. Stefano, J., Cordeiro, D., Marra, M., Richter, E., & Muñoz, R. (2016). Batch-injection versus Flow-injection analysis using screen-printed electrodes: determination of ciprofloxacin in pharmaceutical formulations. *Electroanalysis*, *28*, 350-357.
31. Stefano, J., de Lima, A., Montes, R., Richter, E., & Muñoz, R. (2012). Fast Determination of Naproxen in pharmaceutical formulations by Batch injection analysis with pulsed amperometric detection. *J Braz Chem Soc*, *23*, 1834-1838.
32. Tormin, T., Cunha, R., da Silva, R., Muñoz, R., & Richter, E. (2014). Combination of screen-printed electrodes and batch injection analysis: a simple, robust, high-throughput, and portable electrochemical system. *Sensors and actuators B: chemical*, *202*, 93-98.
33. Tormin, T., Rodrigues Cunha, R., Bezerra da Silva, R., Abarza Munoz, R., & Richter, E. (2014). Combination of screen-printed electrodes and batch injection analysis: a simple, robust, high-throughput, and portable electrochemical system. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *202*, 93-98.
34. Tothill, I., & Uludag, Y. (2010). Development of a sensitive detection method of cancer biomarkers in human serum (75%) using a quartz crystal microbalance sensor and nanoparticles amplification system. *Talanta*, *82*, 277-282.
35. Trojanowicz, M., & Kołacińska, K. (2016). Recent Advances in Flow Injection Analysis. *Analyst*, *141*, 2085-2139.
36. Wang, J. (2000). *Analytical Electrochemistry* (2nd ed.). Wiley-VCH.

37. Wang, J. (2002). Portable electrochemical systems. *Trends in Analytical Chemistry*, 21, 226-232.
38. Wang, J., & Taha, Z. (1991). Batch injection analysis . *Analytical Chemistry*, 63, 1053-1056.
39. Wang, J., & Taha, Z. (1991). Batch injection with potentiometric detection . *Anal. Chim. Acta*, 252, 215-221.
40. Wang, J., & Tian, B. (1992). Screen-printed electrodes for stripping measurements of trace mercury. *Analytical Chemistry*, 15, 1706-1709.
41. Wei, S., Song, G., & Lin, J.-M. (2005). Separation and determination of norepinephrine, epinephrine, isoprenaline enantiomers by capillary electrophoresis in pharmaceutical formulation and human serum. *Journal of Chromatography A*, 1095, 166-171.
42. Xiaorong, T., Yuanxi, S., Bing, Y., Fei, H., & Xingyao, Z. (1997). Determination of Epinephrine Using Poly(Neutral Red) Modified Carbon Fibre Microelectrodes by Anodic Stripping Voltammetry. *Wuhan Univ. J. Nat. Sci*, 479-483.